

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra analytické chemie

STUDIUM HILIC MECHANISMU VYBRANÝCH UHPLC STACIONÁRNÍCH FÁZÍ

Autor práce: Kateřina Ježková

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové, 2012

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Analytické chemie

Kandidát: Kateřina Ježková

Školitel: Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium HILIC mechanismu vybraných UHPLC stacionárních fází

Tato diplomová práce se zabývá studiem HILIC mechanismu stacionárních fází Ascentis HILIC Express (2,1 x 100 mm, 2,7 μm , výrobce Sigma-Aldrich), ACQUITY UPLC BEH HILIC (2,1 x 100 mm, 1,7 μm , výrobce Waters) a ACQUITY UPLC BEH AMIDE (2,1 x 100 mm, 1,7 μm , výrobce Waters).

K testování vlastností kolon bylo vybráno celkem 15 analytů, které byly rozděleny do skupin na látky kyselé, bazické a neutrální. Měření probíhalo na přístroji UHPLC od firmy Waters za detekce pomocí PDA detektoru při vlnové délce 254 nm. K měření byla použita isokratická eluce. Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min, nástřik byl 1-2 μl . Mobilní fázi tvořila ultračistá voda nebo pufr a acetonitril.

Pro snadnější hodnocení byly z naměřených hodnot sestrojeny tabulky a grafy. Byly sestrojeny křivky závislosti lin-lin, log-lin a log-log. Kolony byly hodnoceny z hlediska selektivity a retence jednotlivých skupin analytů.

Byl sledován vliv procentuálního zastoupení vody a acetonitrilu v mobilní fázi na retenci analytů. Dále byl sledován vliv pH.

U kolon Ascentis HILIC Express a ACQUITY UPLC BEH HILIC nebyl pozorován výraznější rozdíl v selektivitě. U kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE tvořené BEH částicemi modifikovanými trifunkčně vázaným amidem byl rozdíl v selektivitě ve srovnání s kolonou ACQUITY UPLC BEH HILIC výrazný.

Vliv pH na selektivitu byl zaznamenán u kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE. Selektivita se při pH = 3,8 a pH = 6,8 výrazně lišila. U zbylých dvou kolon neměla hodnota pH na selektivitu téměř žádný vliv.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Kateřina Ježková

Supervisor: Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Diploma thesis: A study of HILIC mechanism on selected UHPLC stationary phases

This diploma thesis deals with a study of HILIC mechanism of Ascentis HILIC Express (2.1 x 100 mm, 2.7 μm , Sigma-Aldrich), ACQUITY UPLC BEH HILIC (2.1 x 100 mm, 1.7 μm , Waters) and ACQUITY UPLC BEH AMIDE (2.1 x 100 mm, 1.7 μm , Waters) stationary phases.

Totally 15 analytes had been selected for testing of the characteristics of the stationary phases. The analytes were divided into groups of acidic, basic and neutral substances. The measurement was performed on UHPLC instrument by Waters with detection by a PDA detector at the wave-length of 254 nm. Isocratic elution was used for the measurement. The flow was set to 0.4 ml/min, injection volume was 1-2 μl . Mobile phase was composed of ultrapure water or buffer and acetonitrile.

For an easier evaluation, tables and charts were constructed from measured data. Lin-lin, log-lin and log-log plots were constructed. The stationary phases were evaluated in terms of selectivity and retention of the individual groups of analytes.

The influence of a percentage of water and acetonitrile in mobile phase on the retention of analytes was monitored. Further, the influence of pH was monitored.

For Ascentis HILIC Express and ACQUITY UPLC BEH HILIC stationary phases no substantial difference in selectivity was observed. For an ACQUITY UPLC BEH AMIDE stationary phase, formed by BEH particles modified by a trifunctional amide, the difference in selectivity was significant, compared to ACQUITY UPLC BEH HILIC stationary phase.

The effect of pH was observed on ACQUITY UPLC BEH AMIDE stationary phase.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 16. dubna 2012

.....

Kateřina Ježková

Poděkování

Děkuji Doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a pomoc při zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji všem pracovníkům Katedry analytické chemie za příjemné pracovní prostředí a taktéž za finanční podporu grantu GAUK 385311/2011. Velké poděkování patří i mým rodičům a mému příteli za trpělivost a podporu, kterou mi poskytovali během studia.

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíl a zadání práce	9
3. Teoretická část	10
3.1. Základní mechanismus HILIC separace	10
3.2. Stacionární fáze používané v HILIC systému	12
3.3. Vlastnosti použitých stacionárních fází	15
3.4. Mobilní fáze používané v HILIC systému	17
3.5. Vliv teploty při HILIC separacích	19
3.6. HILIC v UHPLC	20
3.7. Výhody a nevýhody HILIC systému	23
3.8. Vyhodnocování mechanismů separace	24
3.9. Vlastnosti použitých analytů	25
4. Experimentální část	28
4.1. Použité chemikálie	28
4.2. Přístrojové vybavení	29
4.3. Použité kolony	29
4.4. Příprava zásobních roztoků	29
4.5. Příprava pracovních roztoků	29
4.6. Příprava vodných složek mobilních fází	30
4.7. Vlastní měření	32
4.8. Schéma experimentů	32
5. Výsledky a diskuse	35
5.1. Vyhodnocení selektivity	35
5.2. Vyhodnocení retence	48
6. Závěr	67
Literatura	69

Seznam použitých zkratk

AcAc	kyselina octová
AcAm	octan amonný
AmF	mravenčan amonný
ACN	acetonitril
BEH	hybridní částice (bridge ethylene hybrid)
EtOH	ethanol
ESI	ionizace elektrosprejem
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
IPA	isopropylalkohol
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NP	normální fáze
RP	reverzní fáze
TEOS	bis(triethoxysilyl)ethan
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

1. Úvod

V současné době rostou požadavky na separaci silně polárních látek, zejména látek biologicky aktivních. V chromatografických systémech s obrácenými fázemi (RP) je retence silně polárních látek příliš nízká na rozdíl od sloučenin nepolárních či středně polárních, které lze touto metodou úspěšně separovat. Při použití normální fáze (NP) se polární látky velmi špatně rozpouštějí v mobilní fázi, kterou tvoří čisté organické rozpouštědlo. Problémem bývá i špatná reprodukovatelnost analýzy. Vhodnou metodou pro účinnou separaci polárních látek může být použití hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), kterou poprvé definoval americký chemik Andrew Alpert v roce 1990. Při této chromatografii se používají kolony typické pro systémy s normálními fázemi, využívají se však vodně-organické mobilní fáze typické pro RP systémy. Předpokládá se, že k retenci analyzované látky dochází na základě rozdělovacího mechanismu mezi nepolární mobilní fází a tenkou vodnou vrstvou, která se tvoří v blízkosti stacionární fáze. Detailní mechanismus však není dosud zcela objasněn.

Analýza biologicky aktivních látek zasahuje do mnoha oblastí lidského života a proto je potřeba vyvinout co nejspolehlivější a nejlevnější metody pro jejich stanovení, ať už se jedná o stanovení v biologických vědách nebo v péči o životní prostředí. HILIC metoda je ceněna pro svoji vysokou selektivitu a velmi dobrou retenci polárních látek. Ve spojení s ultravysokoučinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC) se HILIC metoda stává stále významnější a přináší mnoho prostoru pro další výzkum.

2. Cíl a zadání práce

Tato diplomová práce se zabývá studiem HILIC mechanismu tří vybraných stacionárních fází. Pro experimentální měření byla vybrána široká skupina analytů zahrnujících látky neutrální, kyselé a bazické. Byl sledován vliv složení mobilní fáze na retenci jednotlivých analytů a selektivitu vybraných kolon. Zejména byl sledován vliv procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi, druh, pH a koncentrace vodné složky. Měření bylo prováděno systematicky na všech třech stacionárních fázích. Z naměřených experimentálních dat byly sestrojeny křivky závislosti typu lin-lin, log-lin či log-log pro snadnější vyhodnocování retenčních mechanismů a selektivity kolon.

3. Teoretická část

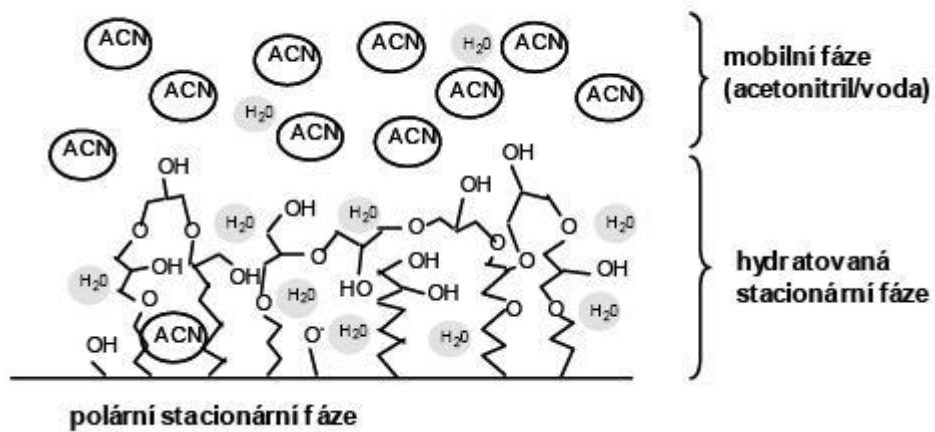
Kapalinová chromatografie je využívána pro separaci biologicky aktivních látek více než sto let. Původní kapalinová chromatografie na normální fázi byla nahrazena separacemi na reverzních fázích, u kterých je separační účinnost při vhodně zvolených experimentálních podmínkách výrazně vyšší, zejména pro nepolární látky. Tato metoda je nejčastěji používanou technikou ve farmaceutické analýze [1]. Zavedení ultravysokoučinné kapalinové chromatografie (UHPLC) do praxe v roce 2004 přineslo výrazný pokrok v oblasti analytické chemie. Došlo ke zkrácení kolon, zmenšení částic až na velikost menší než 2 μm (tzv. sub-2-mikronové částice), a zvýšení tlaku (>100 MPa). Celá analýza se tak výrazně urychlila a zlevnila [2][3].

Separace polárních analytů na klasických reverzních fázích může být v některých případech značně komplikovaná. Polární látky jsou často eluovány v mrtvém retenčním čase. Při použití systému normálních fází narážíme na problém špatné rozpustnosti vzorků v bezvodých rozpouštědlech. Řešení problému separace polárních látek přinesl v roce 1990 Andrew Alpert, který navrhl označení „hydrofilní interakční chromatografie“ (HILIC) pro chromatografii na kolonách typických pro systémy s normálními fázemi, využívající však vodně-organické mobilní fáze podobně jako RP systémy. Termín „hydrofilní“ charakterizuje afinitu k vodě, která se přidává do mobilní fáze při HILIC separacích na polárních kolonách. Dochází zde k hydrofilním interakcím mezi stacionární fází a separovanými látkami. Tato technika našla uplatnění při separacích sacharidů, peptidů a aminokyselin. V poslední době roste její význam a zároveň roste i počet nově vyvinutých kolon a aplikací pro analýzu v oblasti přírodních látek i syntetických léčiv, potravin, tenzidů a životního prostředí [1][4][5].

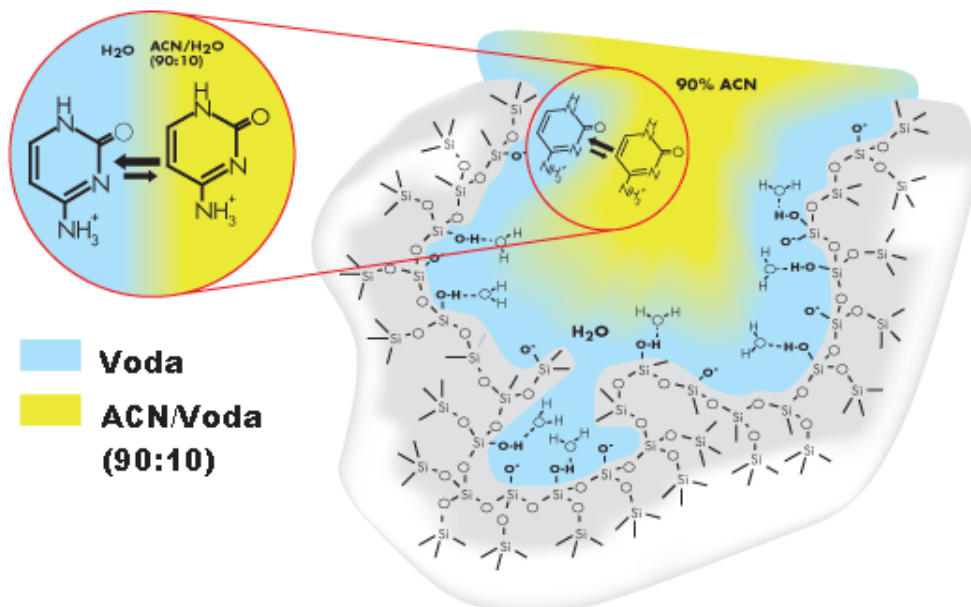
3.1. Základní mechanismus HILIC separace

V ideálním případě je separace HILIC řízena hydrofilní interakcí mezi polární stacionární fází a solutem. Uplatňují se i druhotné interakce, například elektrostatické interakce, iontově výměnné interakce a další. Důležitá je však převaha interakcí hydrofilních. Na povrchu sorbentu stacionární fáze se vytváří hydratovaná vrstva

(z angl. „water-rich layer“), která hydrofilní interakce umožňuje (Obr. 1). Látka se pak podle Alperta zadržuje na základě rozdělovacího mechanismu (Obr. 2) [1][5]. Naproti tomu švédský chemik P. Hemstörn ve svých studiích uvádí, že mechanismus retence je pravděpodobně smíšené povahy a zahrnuje i elektrostatické interakce a mechanismus adsorpce. Detailní mechanismus retence však dosud nebyl zcela objasněn [1].



Obrázek 1: Schéma dioly modifikované stacionární fáze[1].



Obrázek 2: Znázornění rozdělovacího mechanismu v HILIC systému [6].

3.2. Stacionární fáze používané v HILIC systému

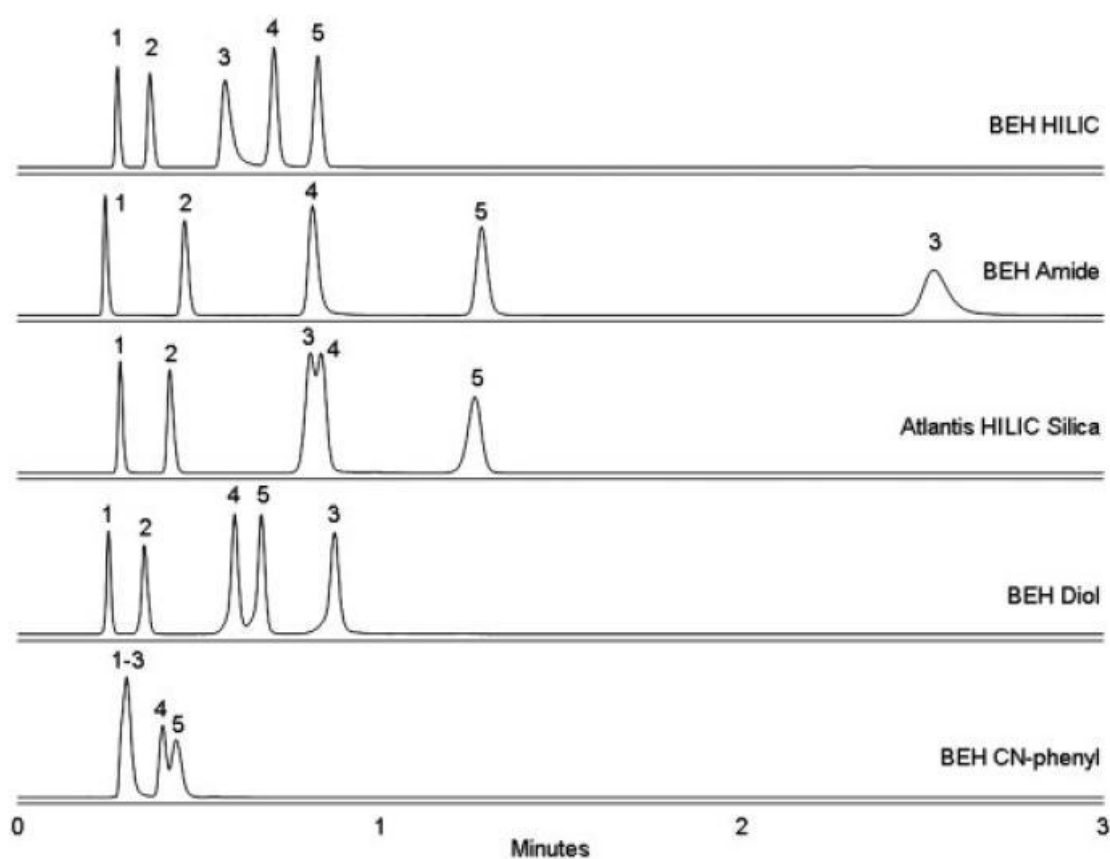
Pro HILIC separace se používají polární stacionární fáze a vodné mobilní fáze. Ty obsahují vysoký podíl organického rozpouštědla (více než 60 %). Stacionární fáze bývá polárnější než fáze mobilní. Při tomto uspořádání je možné dělit polární analyty s vysokým rozlišením. Naopak nepolární analyty, které nevykazují afinitu ke stacionární fázi, nejsou zadržovány. Nejčastěji se používají klasické silikagelové stacionární fáze nebo fáze modifikované aminovými, amidovými, diolovými nebo kyanovými funkčními skupinami. Lze použít i silikagel modifikovaný polymery, např. polyhydroxytehelem či polysufoethylem. Zavedeny byly i sorbenty s chemicky vázanými jednotkami oligosacharidů [1]. Mezi novější stacionární fáze pro HILIC patří např. ZIC-HILIC stacionární fáze, které byly původně vyvinuty pro separaci anorganických solí a malých iontových sloučenin [5]. Na těchto fázích jsou chemicky vázané funkční skupiny nesoucí pozitivní a negativní náboj (tzv. zwitteriontová skupina), které se vyznačují vysokou polaritou a vysokou afinitou k vodě. Struktura některých HILIC stacionárních fází je znázorněna na obr. 3 [1][5].

stacionární fáze	chemická struktura
a.	
silikagel	—OH
kyanopropyl	—(CH ₂) ₃ —CN
aminopropyl	—(CH ₂) ₃ —NH ₂
diol	—CH ₂ —CH—CH ₂ —OH OH
b.	
PAC	—(CH ₂ —CH) _n — C=O OH
c.	
ZIC	—CH ₂ —N [⊕] (CH ₃) ₂ —(CH ₂) ₃ —SO ₃ [⊖] CH ₃

Obrázek 3: Stacionární fáze používané při HILIC; PAC – polymerní aniontová fáze, ZIC – zwitteriontová fáze [1].

BEH částice jsou vysoce mechanicky a chemicky odolné i za extrémních podmínek jako je vysoká teplota, tlak a rozmezí pH 1-12. Životnost kolon s těmito částicemi je velmi vysoká a literatura uvádí, že je možné provést až 10000 nástřiků [2].

Rozsah chemických modifikací HILIC fází není široký, přesto jsou v selektivitě výrazné rozdíly. Rozdíl v selektivitě různých HILIC stacionárních fází je znázorněn na obrázku 5.



Obrázek 5: Srovnání různých HILIC stacionárních fází za použití izokratické mobilní fáze (90 : 10 ACN/H₂O) s 10 mM mravenčanem amonným o pH 3. Průtok byl 0,5 ml/min, teplota kolony 30 °C a UV detektor nastaven na vlnovou délku 254 nm. Pořadí eluce: (1) acenaften 20 µg/ml, (2) thymin 4 µg/ml, (3) fluorooroditová kyselina 25 µg/ml, (4) adenin 4 µg/ml, (5) cytosin 8 µg/ml)[10].

3.3. Vlastnosti použitých stacionárních fází

V této diplomové práci byl studován HILIC mechanismus tří vybraných UHPLC stacionárních fází, proto jsou tyto fáze dále podrobněji popsány.

3.3.1. Kolona ACQUITY UPLC BEH HILIC (výrobce Waters)

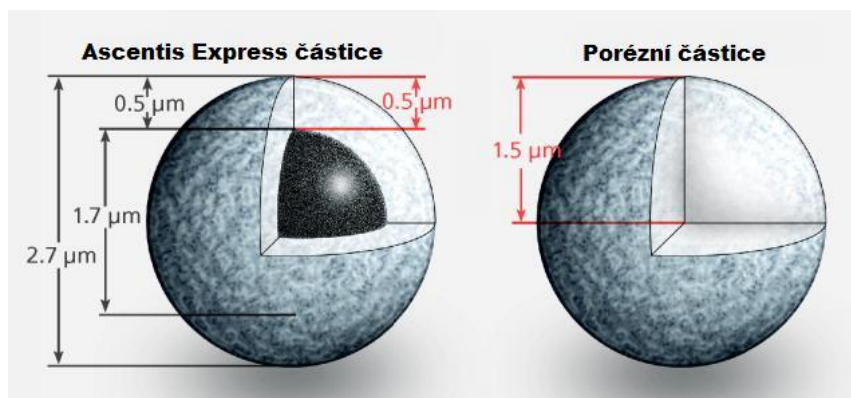
BEH částice (podrobněji popsány v předchozí kapitole, obr. 4) zajišťují této koloně chemickou stabilitu a její delší životnost i při širším rozsahu pH mobilní fáze. Kolona umožňuje velmi efektivní a reprodukovatelné analýzy polárních látek za vysokého tlaku i teploty v rozsahu pH 1-12 [11].

3.3.2. Kolona Ascentis Express HILIC (výrobce Sigma-Aldrich)

Tato kolona využívající technologii Fused-Core částic poskytuje vysokou rychlost a účinnost analýzy za použití nižších tlaků. Fused-Core částice jsou tvořeny tenkou porézní vrstvičkou čistého oxidu křemičitého obklopující pevné křemičité jádro. Toto uspořádání částic zajišťuje vysokou účinnost díky malé difúzní vzdálenosti (0,5 μm) a malé celkové velikosti částice (2,7 μm) [12].

Rychlost vstupu i výstupu složky separované směsi z pórů částice je řízena difúzí jednotlivých komponent v kapalně mobilní fázi a závisí na velikosti částic složky. Čím je složka větší, tím pomaleji difunduje. Pomalá difúze pak způsobuje, že jsou píky široké a separace nedokonalá. Řešením tohoto problému by mohlo být použití neporézních částic. Avšak důležitou součástí separačního procesu je i interakce složek se skupinami na povrchu pórů. Proto čím větší počet molekul může interagovat, tím více směsi je možné rozdělit. Neporézní částice umožňují interakce pouze na svém vnějším povrchu [13][14][15].

Zkrácením difúzní vzdálenosti u povrchově porézní částice při zachování dostatečného počtu molekul schopných interakce dochází k menšímu rozmývání chromatografických zón, což vede k vyšší účinnosti kolony [13].



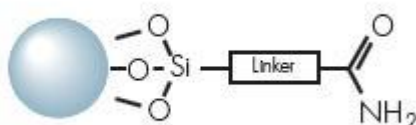
Obrázek 6: Porovnání difúzní vzdálenosti Fused-Core částice s porézní částicí [16].

Další výhodou Fused-Core částice je její celková velikost 2,7 µm. Kolony plněné částicemi této velikosti mohou být použity ve standardních HPLC přístrojích, neboť k dosažení požadovaných průtokových rychlostí nevyžadují zvýšený tlak, který roste exponenciálně s klesající velikostí částic. Při průtokové rychlosti 4 mm s⁻¹ dosahuje tlak na koloně plněné Fused-Core částicemi hodnot 24,8 MPa, kdežto u kolon plněných částicemi o velikosti 1,7 µm dosahuje tlak hodnot 55,8 MPa [13].

Díky čistému silikagelu můžeme tuto kolonu použít pro tradiční NP separace nebo pro HILIC separace kyselých, bazických i neutrálních částic. Optimální pH mobilní fáze pro tuto kolonu se pohybuje v rozmezí 2-8. Kolona je stabilní při operačním tlaku do 600 bar [12].

3.3.3. Kolona ACQUITY UPLC BEH Amide (výrobce Waters)

Tato amidová kolona byla navržena pro separaci velmi polárních látek, které nejsou zadržovány v klasickém RP systému. Kolona vykazuje vysokou chemickou stabilitu a umožňuje použití širokého rozmezí pH mobilní fáze (pH 2-11). Kolona je tvořena BEH částicemi modifikovanými trifunkčně vázaným amidem (Obr. 7). Amidové kolony jsou vhodné především pro separaci bazických látek [17].



Obrázek 7: Silikagel modifikovaný trifunkčně vázaným amidem [17].

3.4. Mobilní fáze používané v HILIC systému

Mobilní fáze používané při HILIC separacích obsahují vysoké procento organického rozpouštědla a 5-40 % vody nebo pufru (obvykle mravenčanu nebo octanu amonného). Podíl vody musí být minimálně 3 %, aby došlo k vytvoření vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze. Výběr organického rozpouštědla má velký vliv na retenci zkoumaných látek. Eluční síla organického rozpouštědla obvykle roste podle zvyšující se polaritě a schopnosti účastnit se proton-donorových a proton-akceptorových interakcí v pořadí [18][19]:

methanol > ethanol > 2-propanol > tetrahydrofuran > acetonitril

Methanol se pro HILIC separace používá jen zřídka pro jeho podobnost s vodou. Jedná se o protické rozpouštědlo, které na povrchu stacionárních fází s vodou soupeří a dochází mezi nimi k vytváření vodíkových vazeb. To v menší míře platí i pro ostatní alkoholy, nikoliv však pro acetonitril, který proton-donorové interakce nevykazuje a je nejpoužívanějším organickým rozpouštědlem při HILIC separacích [18][19].

V mobilních fázích s vysokým obsahem acetonitrilu retence látek klesá s rostoucí koncentrací vodné složky, která zde představuje polárnější rozpouštědlo. Při nižších koncentracích acetonitrilu se mechanismus retence na mnoha typech polárních kolon mění a chromatografické chování odpovídá separacím v RP systémech – retence roste s rostoucím podílem vody v organické fázi [4].

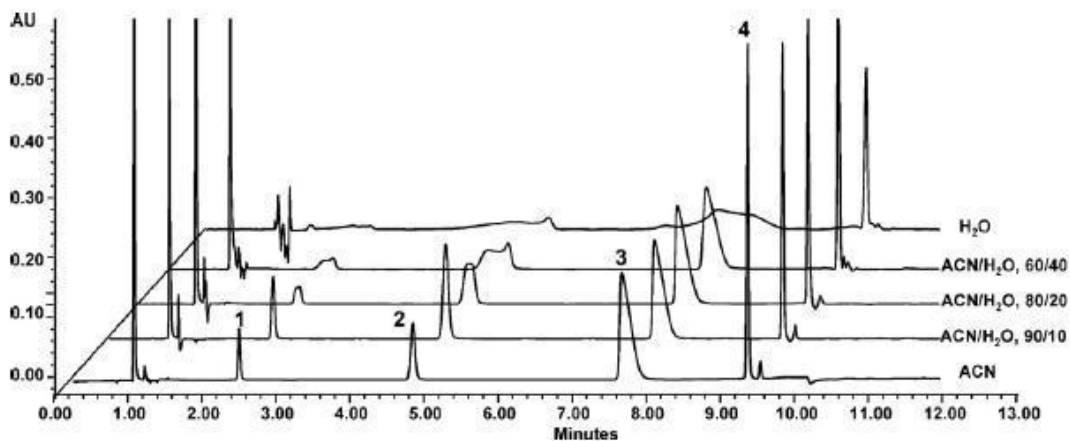
Hodnota pH mobilní fáze je důležitým chromatografickým faktorem. Ovlivňuje náboj stacionární fáze a rozpouštěných látek. Obecně se dá říci, že nabitě částice jsou hydrofilnější než jejich neutrální formy, a proto jsou v HILIC systému více zadržovány. Vliv pH mobilní fáze na retenci analytů je řízen primárně disociačními konstantami jednotlivých protonizovaných funkčních skupin (pKa) typických pro danou látku. Různý stupeň protonizace analytů tedy určuje jejich afinitu ke stacionární fázi [1][20].

Přídavkem pufru do mobilní fáze může být ovlivněna elektrostatické interakce mezi analyty a stacionární fází. Vyšší koncentrace pufru vede ke snížení retence

nabíých částic opačného náboje, než je stacionární fáze, a naopak částice se stejným nábojem jsou zadržovány více. Nejčastěji používanými pufrů jsou octan amonný, mravenčan amonný, triethylamin fosfát a chloristan sodný [20].

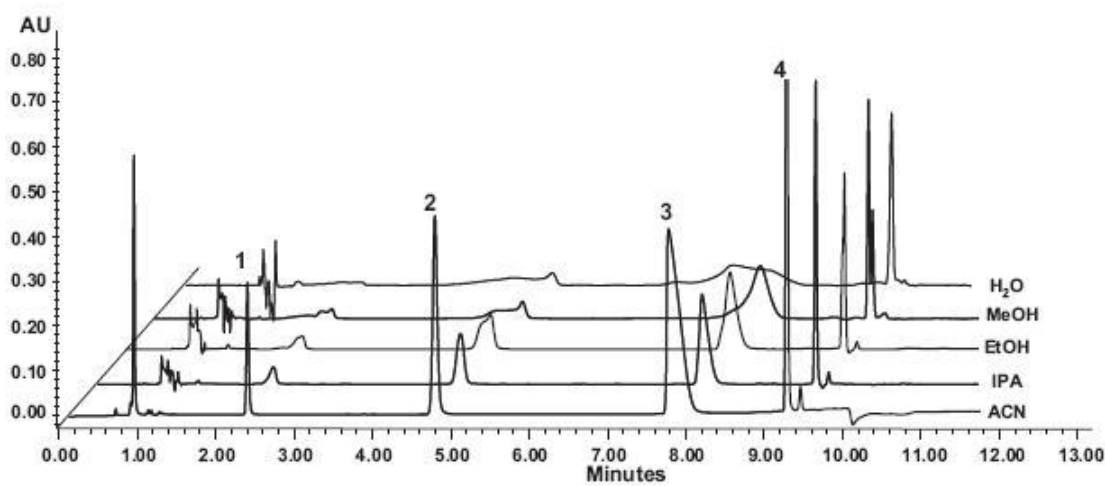
Vliv na retenci má i koncentrace pufru. S rostoucí koncentrací roste i retence. Tento jev je vysvětlován tím, že pufr má tendenci se hromadit v tenké vodné vrstvě na povrchu stacionární fáze a objem této vrstvy se zvětšuje, což vede k zesílené retenci [20].

Při HILIC separaci je důležité věnovat pozornost i rozpouštědlu vzorku. Nejčastěji používaným rozpouštědlem vzorku v HILIC systému je acetonitril. Poměr acetonitrilu a vody má velký vliv na výsledný tvar píku. Obecně platí, že vzorek by měl být rozpouštěn v rozpouštědle, které je svým složením co nejpodobnější mobilní fázi jako u všech HPLC separací, avšak v případě HILIC separace je tento faktor daleko kritičtější. Například při použití mobilní fáze o složení 95 % ACN : 5 % H₂O by podíl vody v rozpouštědle vzorku neměl být vyšší než 10 %. Vliv rozpouštědla na tvar píku je znázorněn na obrázku 8 [21].



Obrázek 8: Efekt podílu vody v rozpouštědle na tvar píku. Podmínky: kolona Acquity BEH HILIC (2,1 mm x 150 mm, 1,7 μm), průtok 500 μl/min, λ = 214 nm, nástřik 5 μl, gradientová eluce: 95 % ACN 6 min, poté 95-75 % ACN 5 min při teplotě T = 30 °C, pořadí eluce: (1) hypoxantin 80 μl/ml, (2) cytosin 10 μl/ml, (3) kyselina nikotinová 30 μl/ml, (4) prokainamid 30 μl/ml [21].

Při použití polárních rozpouštědel jako je methanol (MeOH), isopropylalkohol (IPA), či ethanol (EtOH), dochází k podélnému rozmývání píků. To je pravděpodobně způsobeno jejich schopností tvořit vodíkové vazby, které mohou narušovat vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze a dochází k narušení HILIC rovnováhy. Proto nejsou tato protická polární rozpouštědla v HILIC systému příliš vhodná a dává se přednost aprotickému acetonitrilu. Porovnání vlivu jednotlivých rozpouštědel na tvar píku je znázorněno na obrázku 9 [21].



Obrázek 9: Efekt různých organických rozpouštědel na tvar píku. Podmínky: kolona Acquity BEH HILIC (2,1 mm x 150 mm, 1,7 μm), průtok 500 μl/min, λ = 214 nm, nástřik 5 μl, gradientová eluce: 95 % ACN 6 min, poté 95-75 % ACN 5 min při teplotě T = 30 °C, pořadí eluce: (1) hypoxantin 80 μl/ml, (2) cytosin 10 μl/ml, (3) kyselina nikotinová 30 μl/ml, (4) prokainamid 30 μl/ml [21].

3.5. Vliv teploty při HILIC separacích

Vliv teploty byl studován pomocí van't Hoffovy rovnice, která popisuje vztah mezi retencí a teplotou kolony:

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi$$

kde ΔH° a ΔS° jsou změny entalpie a entropie mezi mobilní a stacionární fází, R je univerzální plynová konstanta a ϕ je fázový poměr [1][20][22].

Při zvýšené teplotě se zrychluje kinetika částic a klesá viskozita. Retence obvykle klesá, což je pravděpodobně způsobeno slabšími kohezními silami, vodíkovými vazbami a ostatními polárními interakcemi mezi mobilní a stacionární fází. Tento vliv však není příliš veliký. [18].

3.6. HILIC v UHPLC

Současný trend zmenšování částic vede k účinnějším a rychlejším analýzám. Menší částice však kladou vyšší nároky na použité zařízení. Standardní HPLC přístroje pracují do tlaků 40 MPa. Problém rostoucího tlaku se zde řeší zkracováním délky kolony, protože tlaková změna na koloně ΔP je definována jako:

$$\Delta P \sim F \cdot \eta \cdot L / A \cdot dp$$

kde ΔP je změna tlaku, F je průtoková rychlost, η viskozita mobilní fáze, L délka kolony, A její průřez a dp průměr částic náplně. Určitá délka kolony je však nezbytností pro zachování dostatečně účinné separace, proto je třeba hledat další řešení než jen zkrácení délky kolony [13].

V roce 2004 představila firma Waters nové stacionární fáze s velikostí částic 1,7 μm podporované přístrojem ACQUITY UPLC, který na rozdíl od předchozí generace umožňuje bezpečně a reprodukovatelně pracovat s tlaky přes 100 MPa, tedy s více než dvojnásobnými ve srovnání s předchozími přístroji. Vznikla nová technika UHPLC (ultra účinná kapalinová chromatografie), která umožňuje velmi rychlé, účinné a citlivé analýzy a navíc mnohonásobně snižuje objemy vzorků a rozpouštědel. Šetří se tak čas i náklady. Nevýhodou může být vysoká pořizovací cena celého zařízení [13][23].

HILIC v kombinaci s UHPLC přináší vysoce efektivní a citlivou metodu pro separaci polárních sloučenin, jejichž stanovení bývá při RP separacích problematické. Přehled nedávno publikovaných prací zaměřených na použití HILIC v UHPLC uvádí tabulka 1.

Látka	Typ materiálu	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Technika	Citace
hypoxantin, kreatinin, prolin, butylkarnitin, fenylacetylglutamin	moč pacientů s rakovinou jater	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 50 mm, 1,7 μm	A: 100 mM mravenčan amonný B: ACN	UPLC-MS/MS	[24]
L-citrulin	plasma	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 100 mm, 1,7 μm	A: voda, 0,1 % kyselina mravenčí B: ACN, 0,1 % kyselina mravenčí	UPLC-MS/MS	[25]
nikotin, kotinin, trans-3'-hydroxykotlinin, vareniklin	plasma	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 100 mm, 1,7 μm	A: 10 mM mravenčan amonný pH = 3 B: ACN	UPLC-MS/MS	[26]
acetylcholin, histamin	mozkomíšní tekutina potkana	Kinetex Core-Shell 2,1 × 100 mm, 2,6 μm	A: 0,2 % kyselina mravenčí a 20 mM mravenčan amonný ve vodě B: ACN	UPLC-MS/MS	[27]
sfinhosin-1-fosfát	plasma	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 150 mm, 1,7 μm	A: 30 mM octan amonný pH = 4 B: ACN, MeOH, octan amonný pH = 4	UPLC-MS/MS	[28]
kyselina kyanurová, melamin	potkaní sérum	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 100 mm, 1,7 μm	A: ACN B: 10 mM octan amonný ve vodě	UPLC-MS/MS	[29]
dimethylsulfopropionát	mořský plankton	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 50 mm, 1,7 μm	A: voda, 2 % ACN B: ACN	UPLC-MS/MS	[30]
acetylcholin, cholin, betain, dimethylglycin	plasma, sérum, mozkomíšní mok, plodová voda, moč	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 100 mm, 1,7 μm	A: 15 mM mravenčan amonný pH = 3,5, ACN B: ACN	UPLC-MS/MS	[31]

Tabulka 1: Přehled publikovaných prací využívajících HILIC v UHPLC.

Látka	Typ materiálu	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Technika	Citace
carbadox, olaquinox	krmivo zvířat	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 100 mm, 1,7 μm	A: voda, 10 mM octan amonný B: ACN	absorbance při 307 nm a 84 nm	[32]
nikotin	moč	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 50 mm, 1,7 μm	A: ACN B: 10 mM octan amonný pH = 3	UPLC-MS/MS	[33]
methylovaná DNA	lidská tkáň	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 100 mm, 1,7 μm	A: ACN B: voda, 2,5 mM mravenčan amonný	UPLC-MS/MS	[34]
panobinostat (LBH589)	tkáň a plasma potkana	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 50 mm, 1,7 μm	A: voda, 0,1 % trifluoroctová kyselina B: methanol, 0,1 % trifluoroctová kyselina	UPLC-MS/MS	[35]
morfin, kodein	moč	ZORBAX HILIC PLUS 2,1 × 100 mm	A: 10 mM mravenčan amonný pH = 6,4 B: 10mM mravenčan amonný pH = 6,4 v 90 % ACN	UPLC-MS/MS	[36]
6-thioguanin	DNA z krve	ACQUITY UPLC BEH HILIC 2,1 × 50 mm, 1,7 μm	A: 160 mM mravenčan amonný B: 10 mM mravenčan amonný v 95 % ACN	UPLC-MS/MS	[37]

Tabulka 1 - pokračování: Přehled publikovaných prací využívajících HILIC v UHPLC.

Prakticky nejčastěji používanou kolonou je ACQUITY UPLC BEH HILIC. Nejvíce používanou mobilní fází je acetonitril ve směsi s mravenčanem či octanem amonným a vodou. Pro detekci je hojně využívána hmotnostní spektrometrie. Častým materiálem pro analýzu je lidská či potkaní moč nebo plasma. HILIC ve spojení s UHPLC technikou jsou vhodnými nástroji pro analýzu endogenních metabolitů, malých bazických sloučenin, peptidů a sacharidů.

3.7. Výhody a nevýhody HILIC systému

Výhodou HILIC systému je schopnost zadržovat velmi polární látky s použitím mobilní fáze s vysokým podílem organického rozpouštědla. Tato mobilní fáze je vhodná pro LC-MS rozhraní (Liquid chromatography–Mass spectrometry). Její použití vede k omezení matricových efektů a k dosažení vysoké odezvy a citlivosti [5].

Hmotnostní spektrometrie (MS) je detekční metoda, kdy se ze sledovaných atomů nebo molekul generují ionty, které jsou následně děleny podle jejich poměru hmotnosti k náboji a měří se zastoupení jednotlivých druhů separovaných iontů. Tato metoda umožňuje stanovení analytu a zároveň poskytuje kvalitativní informace o jeho struktuře. Nízká retence polárních analytů při použití RP-HPLC/MS s ionizací elektrosprejem (ESI) na silikagelových kolonách může vést ke špatnému rozlišení a nepříznivým vlivům matrice. Mobilní fáze s vysokým obsahem vody může negativně ovlivňovat intenzitu signálu a stabilitu. Mobilní fáze bohaté na acetonitril, které jsou typické pro HILIC separace, mají nižší povrchové napětí a usnadňují tvorbu kapiček. Zlepšují se tak podmínky pro ionizaci elektrosprejem a výrazně se zvyšuje citlivost detekce. To je jedním z hlavních důvodů, proč v současné době roste zájem o HILIC techniku [3][18][19][38].

Při izolaci vzorku z biologické matrice pomocí srážení proteinů či extrakce se vzorek před vlastním stanovením musí často upravovat odpařením rozpouštědla, což může být časově náročné. Použití HILIC mobilní fáze umožňuje přímé nastříknutí vzorku na kolonu bez předchozích zdlouhavých úprav [19].

Nevýhodou HILIC může být nerozpustnost některých látek (např. oligosacharidů) a jejich srážení. Dále je problematické dělit pomocí HILIC polární a nepolární látky zároveň. Pro separaci nepolárních látek je vhodnější nižší podíl organického rozpouštědla v mobilní fázi. Tento problém se dá řešit pomocí gradientové eluce [19].

3.8. Vyhodnocování mechanismů separace

Z naměřených experimentálních dat se sestavují křivky, které usnadňují vyhodnocování retenčních mechanismů a selektivity. Obecně jsou důležité tři typy křivek: lin-lin závislost, log-lin závislost a log-log závislost. Pro sestavení těchto křivek je třeba znát kapacitní faktor, který vypočítáme podle vzorce:

$$k' = \frac{t_r - V_0}{V_0}$$

kde t_r je retenční čas a V_0 mrtvý objem. Kapacitní faktor vyjadřuje eluční charakteristiky složky na určité koloně [39].

Závislost lin-lin vyjádřená jako $k' = f(\%W)$ se používá k vyhodnocení retence. % W vyjadřuje objemový podíl vody v mobilní fázi.

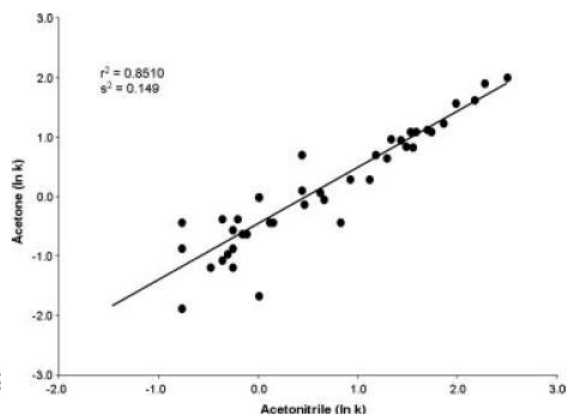
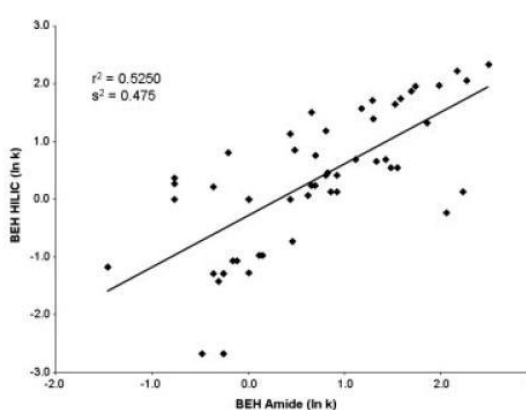
Závislost log-lin vyjádřená jako $\log k' = f(\%W)$ indikuje převahu rozdělovacího mechanismu, pokud je její průběh lineární.

Závislost log-log vyjádřená jako $\log k' = f \log(\%W)$ vypovídá o adsorpčním procesu, pokud je její průběh lineární.

Rozdíl v selektivitě lze vyhodnotit pomocí závislosti kapacitního faktoru každé sloučeniny při dvou různých podmínkách. Zaznamená se lineární průběh a pomocí lineární regrese se získá korelační koeficient r . Rozdíl selektivity s^2 mezi dvěma podmínkami se pak vypočítá pomocí vzorce:

$$s^2 = 1 - r^2$$

Pokud se hodnota s^2 rovná nule, při obou testovaných podmínkách (stacionární fáze, složení mobilní fáze), nedochází k žádným změnám selektivity. Pokud se hodnota s^2 rovná jedné, selektivita je naopak zcela odlišná. Příklad porovnání selektivity dvou různých stacionárních fází je zobrazen na obrázku 10. Na obrázku 11 pak vidíme porovnání retence při dvou různých mobilních fázích.



Obrázek 10: Porovnání selektivity (s^2) mezi BEH HILIC a BEH AMIDE stacionární fází. Pro sestrojení křivky byly použity $\ln k$ data při pH 3 a 9 [10].

Obrázek 11: Porovnání vlivu acetonu a ACN na retenci. Pro sestrojení křivky byly použity $\ln k$ data při pH 3 a 9 [10].

3.9. Vlastnosti použitých analytů

Pro studium HILIC mechanismu v této diplomové práci bylo vybráno 15 látek. Jednalo se převážně o malé polární molekuly. Zastoupeny byly látky kyselé, bazické i neutrální. Následuje stručný popis látek. Přehled látek, triviální a chemický název, pKa, log P a jejich molekulovou hmotnost uvádí tabulka 1.

Adenosin je nukleosid složený z purinové báze adeninu a cukru ribózy. Je přítomný v každé buňce lidského těla a v organismu vzniká při postupném rozkladu ATP při zvýšené potřebě energie. Exogenně podávaný adenosin se používá jako antiarytmikum zejména při léčbě některých supraventrikulárních tachykardií [40][41].

Atenolol a **metoprolol** jsou kardioselektivní betablokátory užívané jako antihypertenziva, dále v léčbě ICHS (angina pectoris, prevence infarktu myokardu) a u poruch srdečního rytmu [40].

Kyselina gentisová a **3,5-dihydroxybenzoová** (kyselina resorcylová) jsou látky chemicky blízké kyselině salicylové. Sodná sůl kyseliny gentisové se používá jako analgetikum, antipyretikum a antirevmatikum [40].

Farnesol je seskviterpenický alkohol přítomný v silicích květů jasmínových, pomerančových a lipových [40].

Hydroxytyrosol a **Tyrosol** jsou fenolické látky obsažené v olivovém oleji. Obě látky jsou významnými oxidanty [42].

Kreatinin je látka vznikající ve svalech z kreatinu. Její koncentrace v krvi odráží funkci ledvin a vyšetření její clearance se používá pro stanovení glomerulární filtrace [40].

Nikotinamid je amid kyseliny nikotinové, která je vitamínem B₃ (též označována jako niacin nebo vitamin PP). Niacin je součástí řady enzymů. Ve vyšších dávkách se používá jako lék k rozšiřování cév a ke snižování hladiny cholesterolu v krvi [40][41].

Paracetamol (též acetaminofen) je derivátem fenacetinu. Využívá se jako analgetikum a antipyretikum [40].

Kyselina salicylová a **p-hydroxybenzoová** jsou fenolické izomerní látky. Kyselina salicylová je výchozí látkou nejběžnějšího antipyretika kyseliny acetylsalicylové. V kožním lékařství se využívá jejího keratoplastického a keratolytického účinku. Estery p-hydroxybenzoové kyseliny (parabeny) se využívají jako protiplísňové konzervační látky pro potravinářství a farmacii. K nejběžnějším patří methylparaben, ethylparaben a propylparaben [40][41].

Šikimová kyselina je charakteristickým meziproduktem biosyntézy mnohých aromatických látek, zejména aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu. [40]

Uracil je heterocyklická sloučenina odvozená od pyrimidinu. Vyskytuje se v ribonukleové kyselině. Významný je jeho derivát fluorouracil používaný jako cytostatikum k terapii kolorektálního karcinomu, také při karcinomu prsu a jiných zhoubných nádorech [40][41].

triviální název	chemický název	log P	pKa	molekulová hmotnost
adenosin	9-(β-D-ribofuranosyl)-9H-purin-6-amin	-0,755±0,553	13,11±0,70 13,11±0,70	267,24
atenolol	2-{4-[(2RS)-2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy]fenyl}acetamid	0,335±0,279	13,88 ± 0,70 9,43 ± 0,10	266,34
dihydroxybenzoová kyselina	3,5-dihydroxybenzoová kyselina	0,808±0,238	3,96±0,10	154,12
farnesol	(2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeka-2,6,10-trien-1-ol	4,828±0,309	14,69 ± 0,10	222,37
gentisová kyselina	2,5-dihydroxybenzoová kyselina	1,396±0,259	3,01 ± 0,10	154,12
hydroxytyrosol	3,4-dihydroxyfenylethanol	0,115±0,217	9,72±0,10	154,16
kreatinin	2-amino-1,5-dihydro-1-methyl-4H-imidazol-4-on	-0,802±0,429	6,89 ± 0,20	113,12
metoprolol	(RS)-1-(isopropylamino)-3-[4-(2-methoxyethyl)fenoxy]propan-2-ol	1,632±0,263	13,89±0,20 9,43 ± 0,10	267,36
nikotinamid	pyridin-3-karboxamid	2,124±1,413	14,83 ± 0,50 3,54 ± 0,11	122,13
paracetamol	N-(4-hydroxyfenyl)acetamid	0,475±0,210	9,86 ± 0,13 1,72 ± 0,50	151,16
p-hydroxybenzoová kyselina	kyselina 4-hydroxybenzoová	1,401±0,221	4,57±0,10	138,12
saliyclová kyselina	kyselina 2-hydroxybenzoová	2,011±0,247	3,01±0,10	138,12
šikimová kyselina	kyselina trihydroxycyklohexenkarboxylová	-2,220±0,399	4,48±0,70	174,15
tyrosol	4-(2-hydroxyethyl)fenol	0,851±0,204	10,17±0,13	138,16
uracil	pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion	-1,037±0,212	8,95 ± 0,10 -4,19 ± 0,20	112,09

Tabulka 2: Vlastnosti jednotlivých analytů.

4. Experimentální část

4.1. Použité chemikálie

Standardy:

- Adenosin 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Atenolol 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Dihydroxybenzoová kyselina > 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Farnesol (směs izomerů) 95 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Gentisová kyselina 98 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Hydroxytyrosol 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Kreatinin (čistota není definována) (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Metoprolol 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Nikotinamid 99,5 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Paracetamol 99,0 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- p-OH-Benzoová kyselina 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Salicylová kyselina > 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Šikimová kyselina 98 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Tyrosol > 99,5 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Uracil \geq 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)

Chemikálie:

- Acetonitril Chromasolv for HPLC gradient grade (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Hydroxid amonný 25 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Kyselina octová koncentrovaná 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Kyselina mravenčí koncentrovaná 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Methanol Chromasolv for HPLC (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Octan amonný 99 % (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- Ultračistá voda Millipore MilliORG (Millipore Corp., USA)

4.2. Přístrojové vybavení

- ACQUITY Ultra Performance LC složený z:
 - ACQ-binary solvent manager (čerpadlo)
 - ACQ-sample manager (autosampler)
 - ACQ-column manager (kolonový termostat)
 - ACQ-PDA detektor (detektor s diodovým polem)
- Analytické váhy Sartorius 2004 MP, SARTOURIUS, Německo
- Vakuová pumpa a filtrační zařízení Millipore (Millipore Corp., USA)
- Automatické pipety se špičkami Biohit (FISHER SCIENTIFIC, ČR)
- Laboratorní pH metr Hanna (FISHER SCIENTIFIC, ČR)

4.3. Použité kolony

- Kolona ACQUITY UPLC BEH AMIDE (2,1 x 100 mm, 1,7 μm) (Waters, ČR)
- Kolona ACQUITY UPLC BEH HILIC (2,1 x 100 mm, 1,7 μm) (Waters, ČR)
- Kolona Ascentis Express HILIC (2,1 x 100 mm, 2,7 μm) (SIGMA-ALDRICH, ČR)

4.4. Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky byly připravovány rozpuštěním přibližně 5 mg látky v 5 ml směsi acetonitrilu a vody (50 : 50). Roztoky byly uchovávány v ledničce při teplotě 4 °C. Roztoky kreatininu a farnesolu vykazovaly nestabilitu a proto byly připravovány opakovaně čerstvé.

4.5. Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky byly připravovány dle potřeby ředěním roztoků zásobních. Roztoky byly připravovány v koncentracích 10^{-5} mol/l (s výjimkou roztoku atenololu a metoprololu, které byly připravovány v koncentraci 5×10^{-4}) dle tabulky 3.

	koncentrace látky 10^{-5}	koncentrace látky 5×10^{-4}
směs acetonitrilu a vody (50 : 50)	10 μ l zásobního roztoku + 495 μ l ACN + 495 μ l vody	50 μ l zásobního roztoku + 475 μ l ACN + 475 μ l vody
směs acetonitrilu a vody (70 : 30)	10 μ l zásobního roztoku + 695 μ l ACN + 295 μ l vody	50 μ l zásobního roztoku + 675 μ l ACN + 275 μ l vody
směs acetonitrilu a vody (90 : 10)	10 μ l zásobního roztoku + 895 μ l ACN + 95 μ l vody	50 μ l zásobního roztoku + 875 μ l ACN + 75 μ l vody

Tabulka 3: Příprava pracovních roztoků.

Různé ředění bylo zvoleno proto, aby rozpouštědlo vzorku bylo svým složením co nejpodobnější mobilní fázi (viz. teoretická část).

4.6. Příprava vodných složek mobilních fází

- 0,1 % roztok kyseliny octové byl připravován napipetováním 200 μ l koncentrované kyseliny octové do vody v 200 ml odměrné baňce a následným doplněním vodou po rysku.
- 0,5 % roztok kyseliny octové byl připravován napipetováním 1 ml koncentrované kyseliny octové do vody v 200 ml odměrné baňce a následným doplněním vodou po rysku.
- 50 mM roztok octanu amonného o pH = 3,8 byl připravován napipetováním 713 μ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH = 3,8. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.
- 0,5 mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připravován napipetováním 7,13 μ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo pH = 4,8. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.
- 5 mM roztok octanu amonného o pH = 4,8 byl připravován napipetováním 71,3 μ l koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml

vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo $\text{pH} = 4,8$. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

- 50 mM roztok octanu amonného o $\text{pH} = 4,8$ byl připravován napipetováním 713 μl koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo $\text{pH} = 4,8$. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.
- 50 mM roztok mravenčanu amonného o $\text{pH} = 4,8$ byl připravován napipetováním 471,62 μl koncentrované kyseliny mravenčí do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo $\text{pH} = 4,8$. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.
- 200 mM roztok octanu amonného o $\text{pH} = 4,8$ byl připravován napipetováním 2,852 ml koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo $\text{pH} = 4,8$. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.
- 50 mM roztok octanu amonného o $\text{pH} = 5,8$ byl připravován napipetováním 713 μl koncentrované kyseliny octové do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo $\text{pH} = 5,8$. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.
- 50 mM roztok octanu amonného o $\text{pH} = 6,8$ byl připravován rozpuštěním 0,1927 g čistého octanu amonného ve vodě v 250 ml odměrné baňce a doplněn vodou po rysku. V případě potřeby bylo pH upraveno roztokem amoniaku nebo kyselinou octovou.
- 50 mM roztok octanu amonného o $\text{pH} = 7,8$ byl připravován napipetováním 1927 μl vodného roztoku amoniaku do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok

kyseliny octové, dokud nebylo dosaženo $\text{pH} = 7,8$. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

- 50 mM roztok octanu amonného o $\text{pH} = 8,8$ byl připravován napipetováním 1927 μl vodného roztoku amoniaku do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok kyseliny octové, dokud nebylo dosaženo $\text{pH} = 8,8$. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.
- 50 mM roztok octanu amonného o $\text{pH} = 9,8$ byl připravován napipetováním 1927 μl vodného roztoku amoniaku do kádinky obsahující přibližně 200 ml vody. Za stálého míchání byl pipetou po kapkách přidáván vodný roztok kyseliny octové, dokud nebylo dosaženo $\text{pH} = 9,8$. Následně byl roztok kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.7. Vlastní měření

Měření probíhalo za isokratické eluce. Teplota kolony byla 30 °C. Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min. Teplota autosampleru byla 4 °C. Nástřik byl 1-2 μl . Detekce byla prováděna pomocí PDA detektoru při vlnové délce 254 nm.

4.8. Schéma experimentů

Kolona Ascentis Express HILIC

- testované analyty:
 - adenosin, atenolol, farnesol, hydroxytyrosol, kreatinin, metoprolol, nikotinamid, paracetamol, p-hydroxybenzoová kyselina, salicylová kyselina, tyrosol, uracil
- mobilní fáze:
 - voda
 - 0,1 % AcAc
 - 0,5 % AcAc
 - 50 mM AmAc $\text{pH} = 3,8$
 - 0,5 mM AmAc $\text{pH} = 4,8$
 - 5 mM AmAc $\text{pH} = 4,8$

- 50 mM AmAc pH = 4,8
- 200 mM AmAc pH = 4,8
- 50 mM AmF pH = 4,8
- 50 mM AmAc pH = 5,8
- 50 mM AmAc pH = 6,8
- 50 mM AmAc pH = 7,8

Kolona ACQUITY UPLC BEH HILIC

- testované analyty:
 - adenosin, atenolol, dihydroxybenzoová kyselina, farnesol, gentisová kyselina, kreatinin, metoprolol, nikotinamid, paracetamol, p-hydroxybenzoová kyselina, salicylová kyselina, šikimová kyselina, tyrosol, uracil
- mobilní fáze:
 - voda
 - 0,1 % AcAc
 - 0,5 % AcAc
 - 50 mM AmAc pH = 3,8
 - 0,5 mM AmAc pH = 4,8
 - 5 mM AmAc pH = 4,8
 - 50 mM AmAc pH = 4,8
 - 200 mM AmAc pH = 4,8
 - 50 mM AmF pH = 4,8
 - 50 mM AmAc pH = 5,8
 - 50 mM AmAc pH = 6,8
 - 50 mM AmAc pH = 7,8

Kolona ACQUITY UPLC BEH AMIDE

- testované analyty:
 - adenosin, atenolol, dihydroxybenzoová kyselina, farnesol, gentisová kyselina, kreatinin, metoprolol, nikotinamid, paracetamol, p-hydroxybenzoová kyselina, salicylová kyselina, šikimová kyselina, tyrosol, uracil
- mobilní fáze:
 - voda
 - 0,1 % AcAc
 - 0,5 % AcAc

- 50 mM AmAc pH = 3,8
- 0,5 mM AmAc pH = 4,8
- 5 mM AmAc pH = 4,8
- 50 mM AmAc pH = 4,8
- 200 mM AmAc pH = 4,8
- 50 mM AmF pH = 4,8
- 50 mM AmAc pH = 5,8
- 50 mM AmAc pH = 6,8
- 50 mM AmAc pH = 7,8
- 50 mM AmAc pH = 8,8
- 50 mM AmAc pH = 9,8

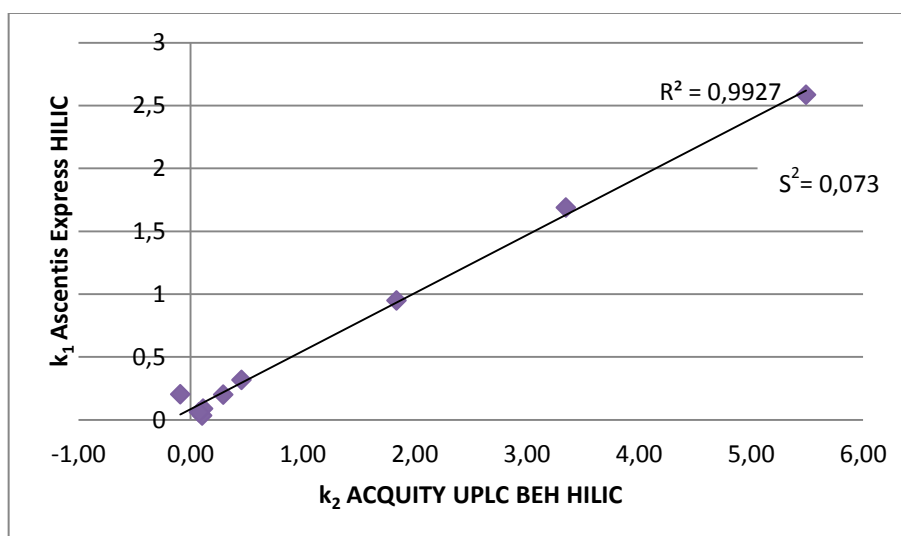
5. Výsledky a diskuse

5.1. Vyhodnocení selektivity

K porovnání selektivity byly sestrojeny křivky závislosti kapacitního faktoru každé sloučeniny na dvou různých kolonách. Selektivita byla porovnáвана při pH = 3,8 a pH = 6,8 a při koncentraci vodné složky 10 % a 15 %.

Látka	k_1 Ascentis Express HILIC	k_2 ACQUITY UPLC BEH HILIC
Adenosin	0,80	
Atenolol	5,49	2,59
Metoprolol	3,35	1,69
Kreatinin	1,84	0,95
Salicylová kys.	-0,09	0,20
Nikotinamid	0,45	0,32
Uracil	0,29	0,20
p-OH-benzoová kys.	0,10	0,03
Paracetamol	0,11	0,09
Farnesol	-0,02	
Tyrosol	0,08	0,06

Tabulka 4: Kapacitní faktory jednotlivých sloučenin při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 15 % (Kolona Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC)

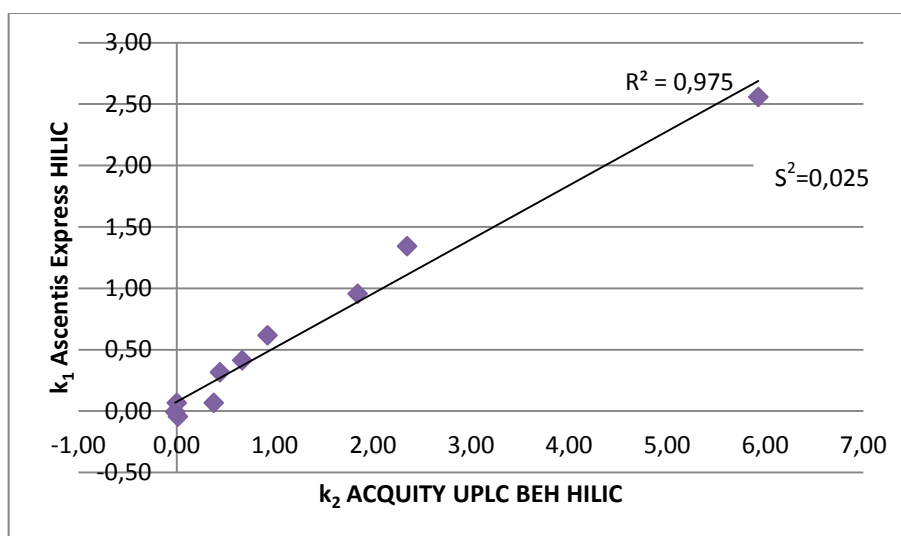


Obrázek 12: Porovnání selektivity kolony Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 15 %.

U kolon Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC byla selektivita při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 15 % srovnatelná. Hodnota $s^2 = 0,073$ (Obr. 12) se blížila nule.

Látka	k_1 Ascentis Express HILIC	k_2 ACQUITY UPLC BEH HILIC
Adenosin	0,93	0,62
Atenolol	5,93	2,56
Metoprolol	2,35	1,34
Kreatinin	1,85	0,95
Salicylová kys.	0,01	-0,05
Nikotinamid	0,44	0,32
Uracil	0,38	0,07
p-OH-benzoová kys.	0,67	0,41
Paracetamol	0,13	
Farnesol	-0,02	-0,01
Tyrosol	0	0,07

Tabulka 5: Kapacitní faktory jednotlivých sloučenin při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 15 %.
(Kolona Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC)

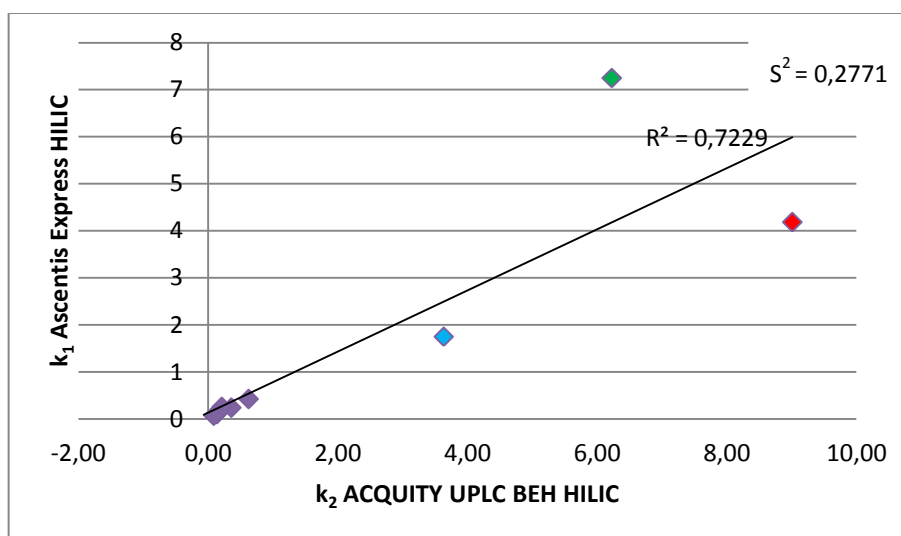


Obrázek 13: Porovnání selektivity kolony Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 15 %.

U kolon Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC byla selektivita při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 15 % srovnatelná. Hodnota $s^2 = 0,025$ (Obr. 13) se blížila nule.

Látka	k_1 Ascentis Express HILIC	k_2 ACQUITY UPLC BEH HILIC
Adenosin	1,35	
Atenolol	6,23	7,25
Metoprolol	9,01	4,18
Kreatinin	3,63	1,75
Salicylová kys.	-0,07	
Nikotinamid	0,62	0,42
Uracil	0,36	0,24
p-OH-benzoová kys.	0,21	0,25
Paracetamol	0,14	0,1
Farnesol	-0,01	
Tyrosol	0,09	0,07

Tabulka 6: Kapacitní faktory jednotlivých sloučenin při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 10 %.
(Kolona Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC)

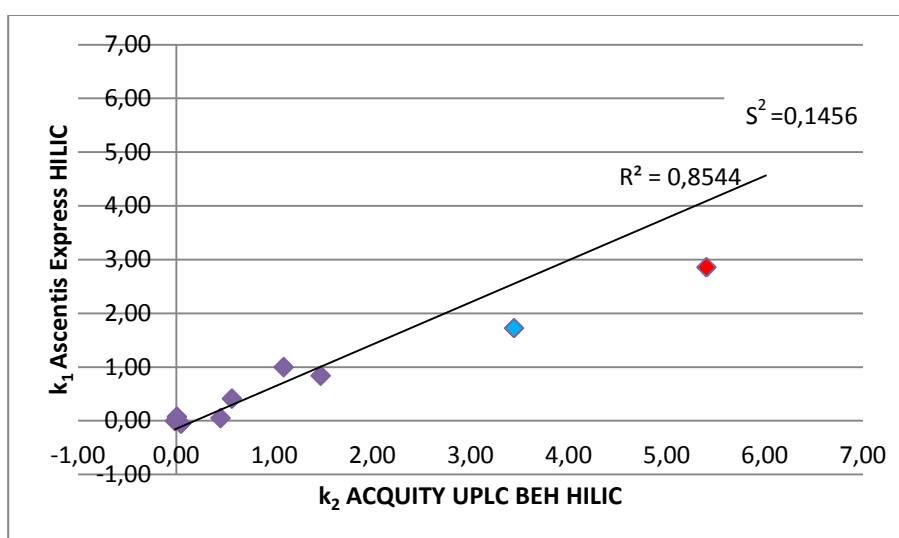


Obrázek 14: Porovnání selektivity kolony Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 10 %.

U kolon Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC byla selektivita při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 10 % podobná pro většinu látek kromě metoprololu, atenololu a kreatininu. Hodnota $s^2 = 0,2771$ (Obr. 14) byla vyšší než hodnota s^2 při koncentraci vodné složky 15 % (Obr. 12). Atenolol (na obr. 14 znázorněn zeleným bodem) byl zadržován více na koloně ACQUITY UPLC BEH HILIC (Tab. 6). Metoprolol (na obr. 14 znázorněn červeným bodem) a kreatinin (na obr. 14 znázorněn modrým bodem) byly zadržovány více na koloně Ascentis Express HILIC (Tab. 6).

Látka	k_1 Ascentis Express HILIC	k_2 ACQUITY UPLC BEH HILIC
Adenosin	1,1	1
Atenolol	6,01	6,14
Metoprolol	5,41	2,85
Kreatinin	3,44	1,72
Salicylová kys.	0,05	-0,06
Nikotinamid	0,57	0,41
Uracil	0,45	0,05
p-OH-benzoová kys.	1,47	0,84
Paracetamol	0,15	
Farnesol	-0,01	-0,01
Tyrosol	0,01	0,07

Tabulka 7: Kapacitní faktory jednotlivých sloučenin při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 10 %.
(Kolona Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC)

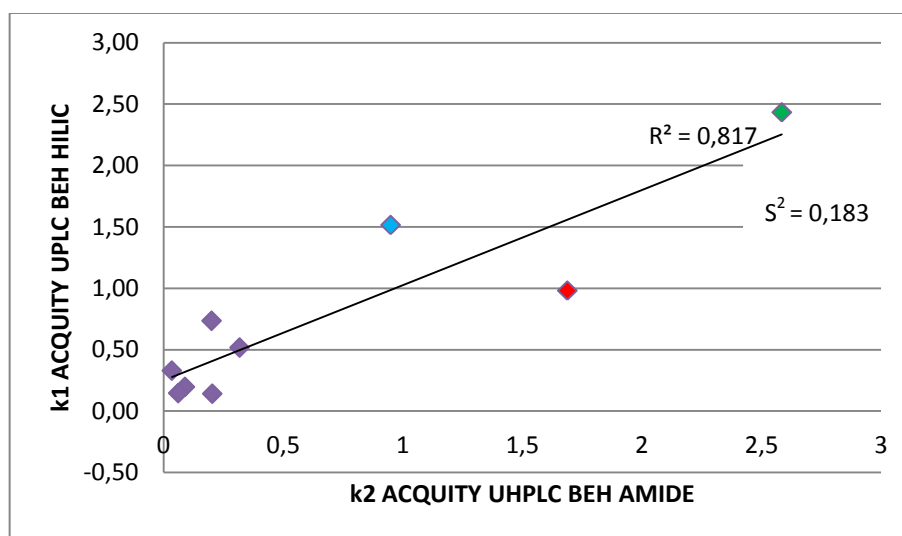


Obrázek 15: Porovnání selektivity kolony Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 10 %.

U kolon Ascentis Express HILIC a ACQUITY UPLC BEH HILIC byla selektivita při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 10 % podobná. Hodnota $s^2=0,1456$ (Obr. 15) byla vyšší než hodnota s^2 při koncentraci vodné složky 15% (Obr. 13). Metoprolol (na obr. 15 znázorněn červeným bodem) a kreatinin (na obr. 15 znázorněn modrým bodem) byly zadržovány více na koloně Ascentis Express HILIC (Tab. 7). Atenolol (na obr. 15 znázorněn zeleným bodem) byl na obou kolonách nejvíce zadržovanou látkou (Tab. 7).

Látka	k_1 ACQUITY UPLC BEH HILIC	k_2 ACQUITY UPLC BEH AMIDE
Adenosin		1,5
Atenolol	2,59	2,43
Metoprolol	1,69	0,98
Kreatinin	0,95	1,52
Salicylová kys.	0,2	0,14
Nikotinamid	0,32	0,52
Uracil	0,2	0,73
p-OH-benzoová kys.	0,03	0,33
Paracetamol	0,09	0,2
Farnesol		-0,01
Tyrosol	0,06	0,15

Tabulka 8: Kapacitní faktory jednotlivých sloučenin při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 15 %.
(Kolona ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UPLC BEH HILIC)

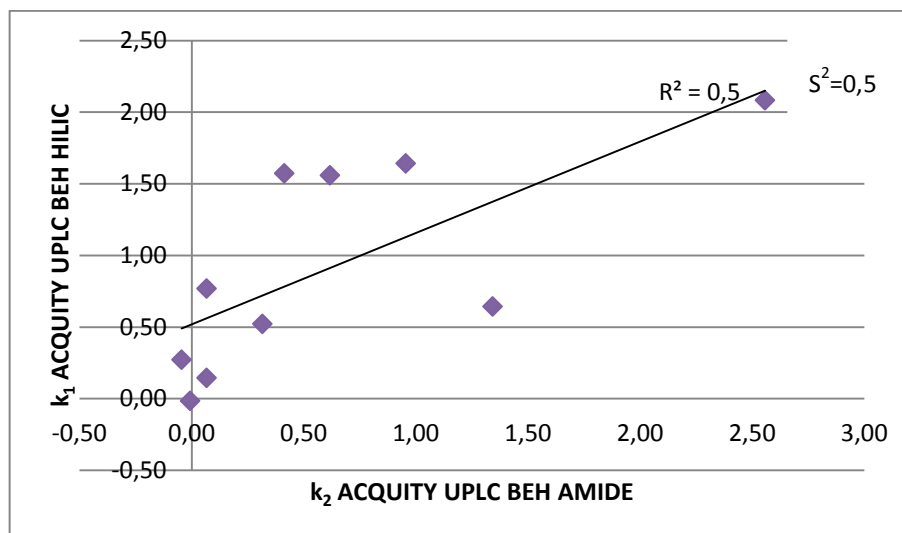


Obrázek 16: Porovnání selektivity kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UHPLC BEH HILIC při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 15 %.

U kolon ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UPLC BEH HILIC byla selektivita při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 15 % odlišná. Atenolol (na obr. 16 znázorněn zeleným bodem) byl na obou kolonách nejvíce zadržovanou látkou (Tab. 8). Metoprolol (na obr. 16 znázorněn červeným bodem) byl více zadržován na koloně ACQUITY UPLC BEH HILIC (Tab. 8). Kreatinin (na obr. 16 znázorněn modrým bodem) byl více zadržován na koloně ACQUITY UPLC BEH AMIDE (Tab. 8).

Látka	k_1 ACQUITY UPLC BEH HILIC	k_2 ACQUITY UPLC BEH AMIDE
Adenosin	0,62	1,56
Atenolol	2,56	2,08
Metoprolol	1,34	0,64
Kreatinin	0,95	1,64
Salicylová kys.	-0,05	0,27
Nikotinamid	0,32	0,52
Uracil	0,07	0,77
p-OH-benzoová kys.	0,41	1,57
Paracetamol		0,2
Farnesol	-0,01	-0,02
Tyrosol	0,07	0,15
Dihydroxybenzoová kys.	0,33	0,55
Šikimová kyselina	2,28	
Gentisová kyselina	0,16	0,58

Tabulka 9: Kapacitní faktory jednotlivých sloučenin při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 15 %.
(Kolona ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UPLC BEH HILIC)

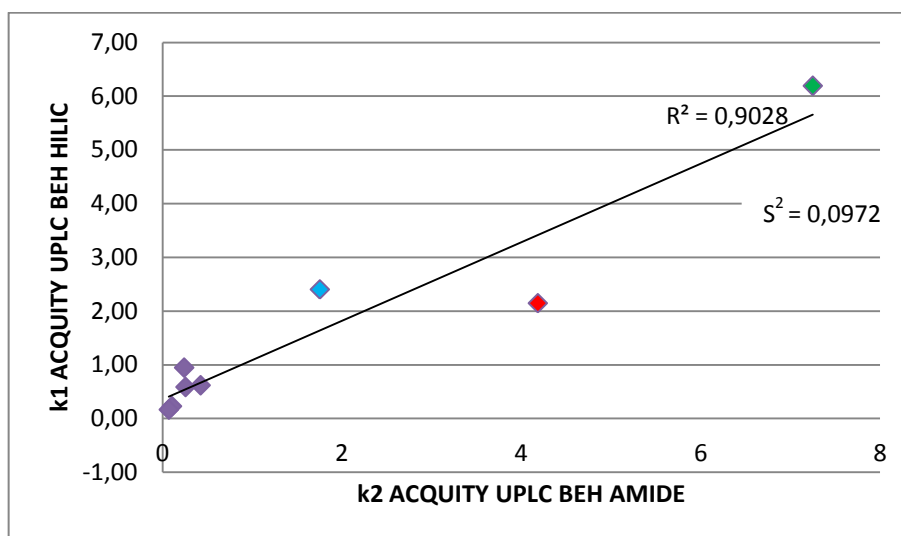


Obrázek 17: Porovnání selektivity kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UHPLC BEH HILIC při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 15 %.

Selektivita kolon ACQUITY UPLC BEH HILIC a ACQUITY UPLC BEH AMIDE se při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 15 % výrazně lišila ($s^2 = 0,5$; obr. 17) výrazněji než při pH = 3,8 (obr. 16). Zadržovány byly i kyseliny dihydroxybenzoová, šikimová a gentisová, které při pH = 3,8 zadržovány nebyly nebo jejich píky byly příliš rozmyté.

Látka	k ₁ ACQUITY UPLC BEH HILIC	k ₂ ACQUITY UPLC BEH AMIDE
Adenosin		2,45
Atenolol	7,25	6,19
Metoprolol	4,18	2,15
Kreatinin	1,75	2,41
Salicylová kys.		0,14
Nikotinamid	0,42	0,62
Uracil	0,24	0,95
p-OH-benzoová kys.	0,25	0,58
Paracetamol	0,1	0,23
Farnesol		-0,02
Tyrosol	0,07	0,16

Tabulka 10: Kapacitní faktory jednotlivých sloučenin při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 10 %.
(Kolona ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UPLC BEH HILIC)

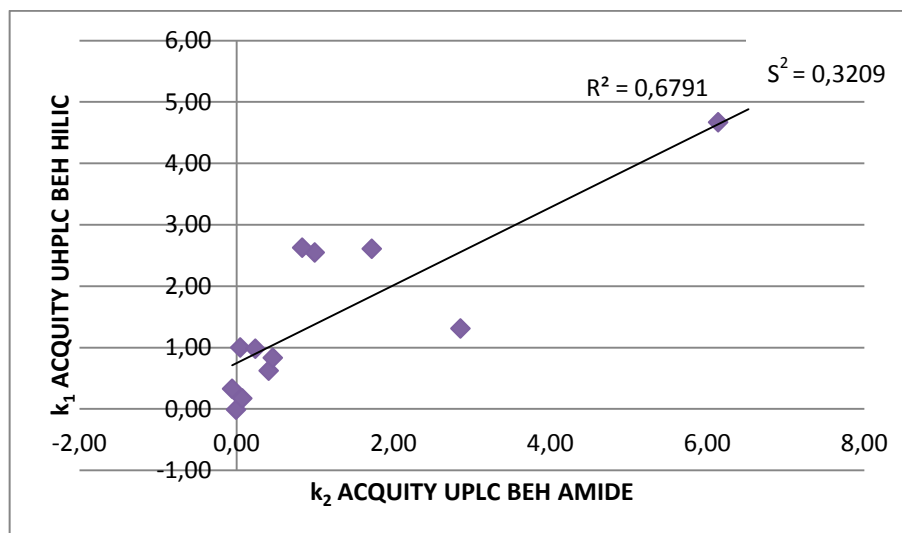


Obrázek 18: Porovnání selektivity kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UPLC BEH HILIC při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 10 %.

Selektivita kolon ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UPLC BEH HILIC byla při pH = 3,8 a koncentraci vodné složky 10 % podobná ($s^2 = 0,0972$; obr. 18). Kreatinin (na obr. 18 znázorněn zeleným bodem) byl více zadržován na koloně ACQUITY UPLC BEH AMIDE (Tab. 10). Atenolol (na obr. 18 znázorněn zeleným bodem) a metoprolol (na obr. 18 znázorněn červeným bodem) byly více zadržovány na koloně ACQUITY UPLC BEH HILIC (Tab. 10).

Látka	k ₁ ACQUITY UPLC BEH HILIC	k ₂ ACQUITY UPLC BEH AMIDE
Adenosin	1	2,55
Atenolol	6,14	4,67
Metoprolol	2,85	1,31
Kreatinin	1,72	2,61
Salicylová kys.	-0,06	0,33
Nikotinamid	0,41	0,62
Uracil	0,05	1
p-OH-benzoová kys.	0,84	2,63
Paracetamol		0,24
Farnesol	-0,01	-0,01
Tyrosol	0,07	0,17
Dihydroxybenzoová kys.	0,46	0,83
Šikimová kyselina	6,52	
Gentisová kyselina	0,24	0,98

Tabulka 11: Kapacitní faktory jednotlivých sloučenin při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 10 %.
(Kolona ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UPLC BEH HILIC)

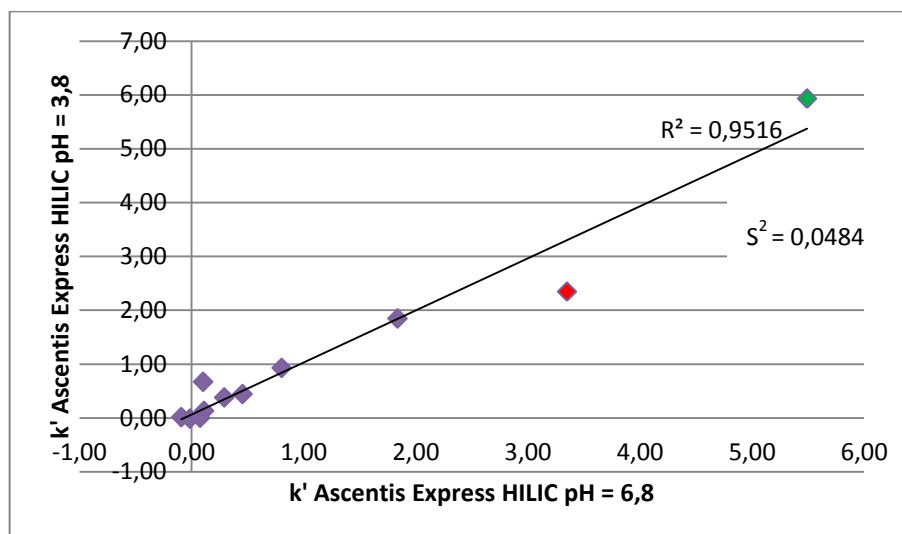


Obrázek 19: Porovnání selektivity kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UHPLC BEH HILIC při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 10 %.

Selektivita kolon ACQUITY UPLC BEH HILIC a ACQUITY UPLC BEH AMIDE se při pH = 6,8 a koncentraci vodné složky 10 % lišila ($s^2 = 0,3209$; obr.19) mnohem výrazněji než při pH = 3,8 (Obr. 18). Zadržovány byly i kyseliny dihydroxybenzoová, šikimová a gentisová, které při pH = 3,8 zadržovány nebyly nebo jejich píky byly příliš rozmyté.

Látka	k	
	Ascentis Express HILIC pH = 3,8	Ascentis Express HILIC pH = 6,8
Adenosin	0,80	0,93
Atenolol	5,49	5,93
Metoprolol	3,35	2,35
Kreatinin	1,84	1,85
Salicylová kys.	-0,09	0,01
Nikotinamid	0,45	0,44
Uracil	0,29	0,38
p-OH-benzoová kys.	0,10	0,67
Paracetamol	0,11	0,13
Farnesol	-0,02	-0,02
Tyrosol	0,08	0,00

Tabulka 12: Kapacitní faktory kolony Ascentis Express HILIC při pH = 3,8 a při pH = 6,8 při koncentraci vodné složky 15 %.

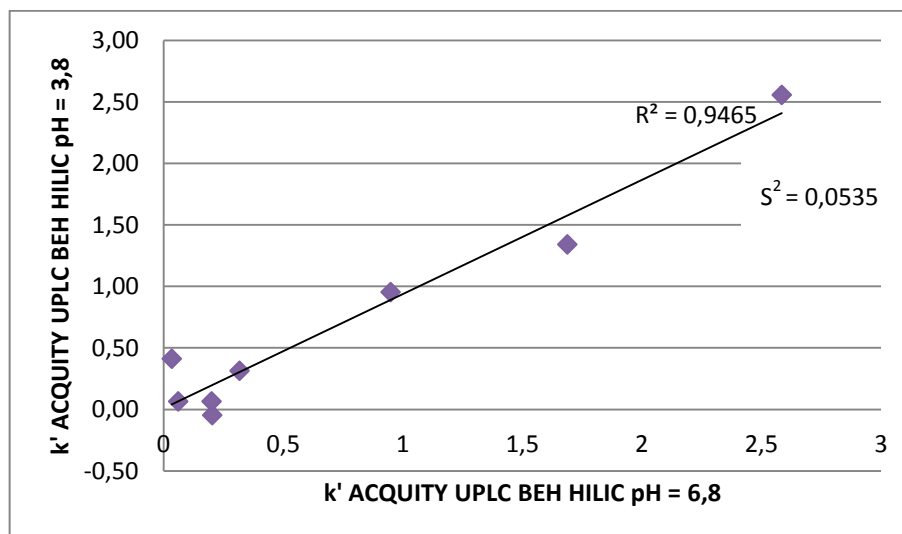


Obrázek 20: Porovnání selektivity kolony Ascentis Express HILIC při pH = 3,8 a pH = 6,8 při koncentraci vodné složky 15 %.

Selektivita kolony Ascentis Express HILIC byla srovnatelná při pH = 3,8 a 6,8. Hodnota $s^2 = 0,048$ (Obr. 20) se blížila nule. Atenolol (na obr. 20 znázorněn zeleným bodem) byl zadržován o něco více při pH = 6,8 (Tab. 12). Metoprolol (na obr. 20 znázorněn červeným bodem) byl zadržován více při pH = 3,8 (Tab. 12). Hodnota pH tedy neměla výrazný vliv na selektivitu kromě metoprololu a atenololu.

Látka	k ACQUITY UPLC BEH HILIC pH = 3,8	k ACQUITY UPLC BEH HILIC pH = 6,8
Adenosin		0,62
Atenolol	2,59	2,56
Metoprolol	1,69	1,34
Kreatinin	0,95	0,95
Salicylová kys.	0,20	-0,05
Nikotinamid	0,32	0,32
Uracil	0,20	0,07
p-OH-benzoová kys.	0,03	0,41
Paracetamol	0,09	
Farnesol		-0,01
Tyrosol	0,06	0,07

Tabulka 13: Kapacitní faktory kolony ACQUITY UPLC BEH HILIC při pH = 3,8 a při pH = 6,8 při koncentraci vodné složky 15 %.

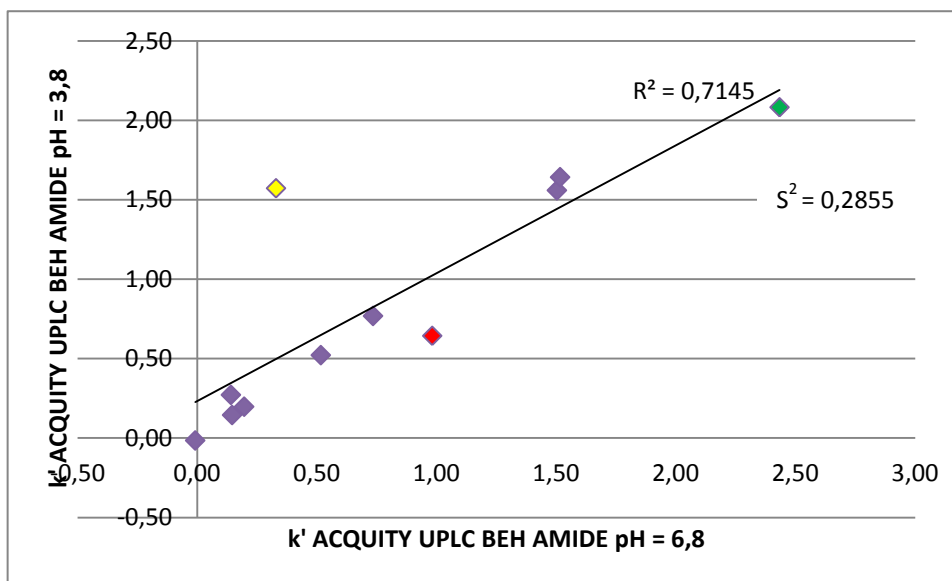


Obrázek 21: Porovnání selektivity kolony ACQUITY UPLC BEH HILIC při pH = 3,8 a pH = 6,8 při koncentraci vodné složky 15 %.

Selektivita kolony ACQUITY UPLC BEH HILIC byla při pH = 3,8 a pH = 6,8 srovnatelná. Hodnota $s^2 = 0,0535$ (Obr. 21) se blížila nule. Hodnota pH tedy neměla výrazný vliv na selektivitu.

Látka	k ACQUITY UPLC BEH AMIDE pH = 3,8	k ACQUITY UPLC BEH AMIDE pH = 6,8
Adenosin	1,50	1,56
Atenolol	2,43	2,08
Metoprolol	0,98	0,64
Kreatinin	1,52	1,64
Salicylová kys.	0,14	0,27
Nikotinamid	0,52	0,52
Uracil	0,73	0,77
p-OH-benzoová kys.	0,33	1,57
Paracetamol	0,20	0,20
Farnesol	-0,01	-0,02
Tyrosol	0,15	0,15

Tabulka 14: Kapacitní faktory kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE při pH = 3,8 a při pH = 6,8 při koncentraci vodné složky 15 %.

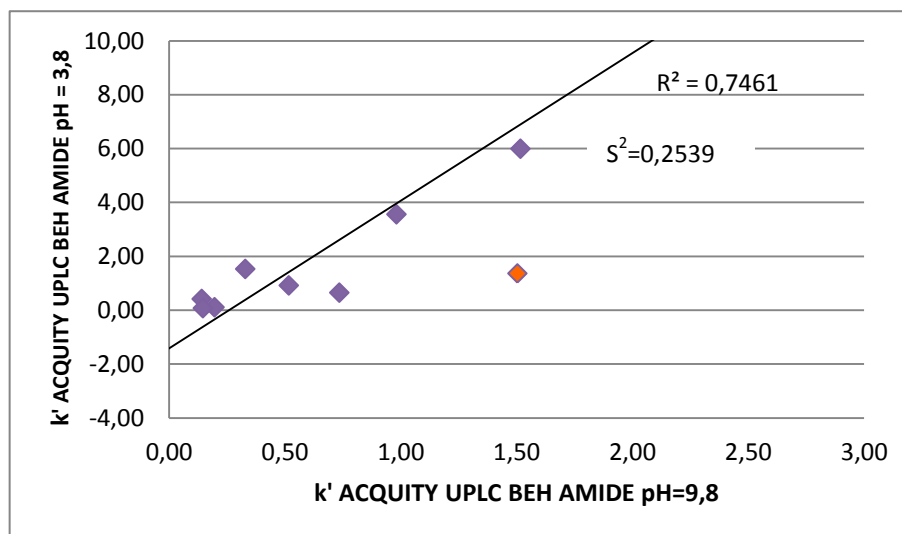


Obrázek 22: Porovnání selektivity kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE při pH = 3,8 a pH = 6,8 při koncentraci vodné složky 15 %.

Selektivita kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE byla při pH = 3,8 a pH = 6,8 velmi rozdílná ($s^2 = 0,2855$; obr. 22). Kyselina p-OH-benzoová (na obr. 22 znázorněna žlutým bodem) byla více zadržována při pH = 6,8 (Tab. 14). Atenolol (na obr. 22 znázorněn zeleným bodem) byl naopak více zadržován při pH = 3,8 (Tab. 14) podobně jako metoprolol (na obr. 22 znázorněn červeným bodem).

Látka	k ACQUITY UPLC BEH AMIDE pH = 3,8	k ACQUITY UPLC BEH AMIDE pH = 9,8
Adenosin	1,50	1,37
Atenolol	2,43	16,42
Metoprolol	0,98	3,56
Kreatinin	1,52	6,00
Salicylová kys.	0,14	0,42
Nikotinamid	0,52	0,92
Uracil	0,73	0,65
p-OH-benzoová kys.	0,33	1,53
Paracetamol	0,20	0,11
Farnesol	-0,01	-0,08
Tyrosol	0,15	0,08

Tabulka 15: Kapacitní faktory kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE při pH = 3,8 a při pH = 9,8 při koncentraci vodné složky 15 %.



Obrázek 23: Porovnání selektivity kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE při pH = 3,8 a pH = 9,8 při koncentraci vodné složky 15 %.

Selektivita kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE byla při pH = 3,8 a pH = 9,8 rozdílná ($s^2 = 0,2539$; obr. 23). Atenolol (na obr. 23 znázorněn zeleným bodem) byl výrazně více zadržován při pH = 9,8. Adenosin (na obr. 23 znázorněn oranžovým bodem) byl naopak více zadržován při pH = 3,8 (Tab. 15).

5.2. Vyhodnocení retence

Pro vyhodnocení retence byly sestrojeny křivky závislosti lin-lin, log-lin a log-log při pH=3,8 a pH=6,8 zvlášť pro kyselé látky, neutrální látky a bazické látky na jednotlivých kolonách.

Závislost lin-lin vyjádřená jako $k' = f(\%W)$ se používá k vyhodnocení retence. % W vyjadřuje objemový podíl vody v mobilní fázi.

Závislost log-lin vyjádřená jako $\log k' = f(\%W)$ indikuje převahu rozdělovacího mechanismu, pokud je její průběh lineární.

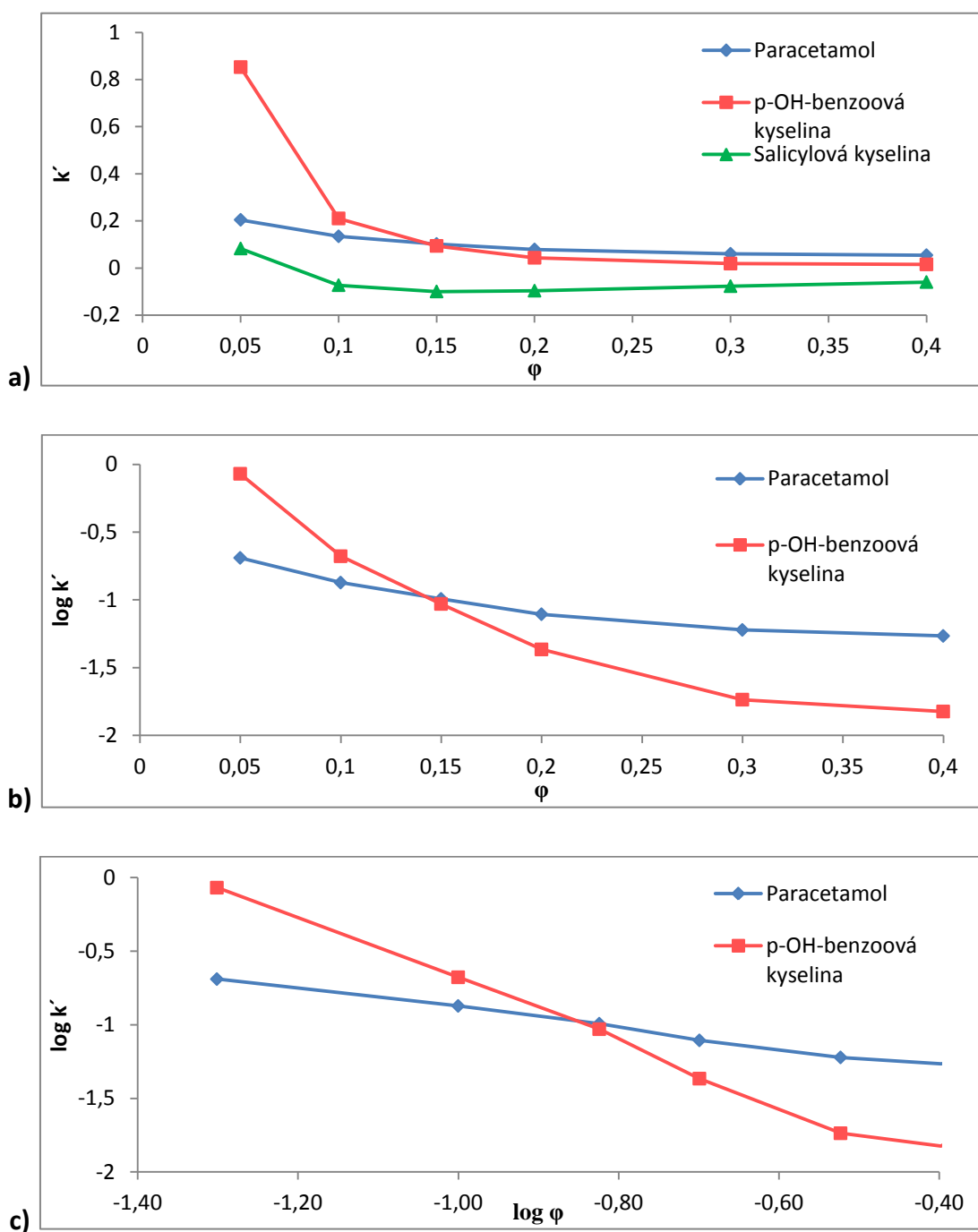
Závislost log-log vyjádřená jako $\log k' = f \log(\%W)$ vypovídá o adsorpčním procesu, pokud je její průběh lineární.

Rozdíl v selektivitě lze vyhodnotit pomocí závislosti kapacitního faktoru každé sloučeniny při dvou různých podmínkách. Zaznamená se lineární průběh a pomocí lineární regrese se získá korelační koeficient r . Rozdíl selektivity s^2 mezi dvěma podmínkami se pak vypočítá pomocí vzorce:

$$s^2 = 1 - r^2$$

Pokud se hodnota s^2 rovná nule, při obou testovaných podmínkách (stacionární fáze, složení mobilní fáze), nedochází k žádným změnám selektivity. Pokud se hodnota s^2 rovná jedné, selektivita je naopak zcela odlišná.

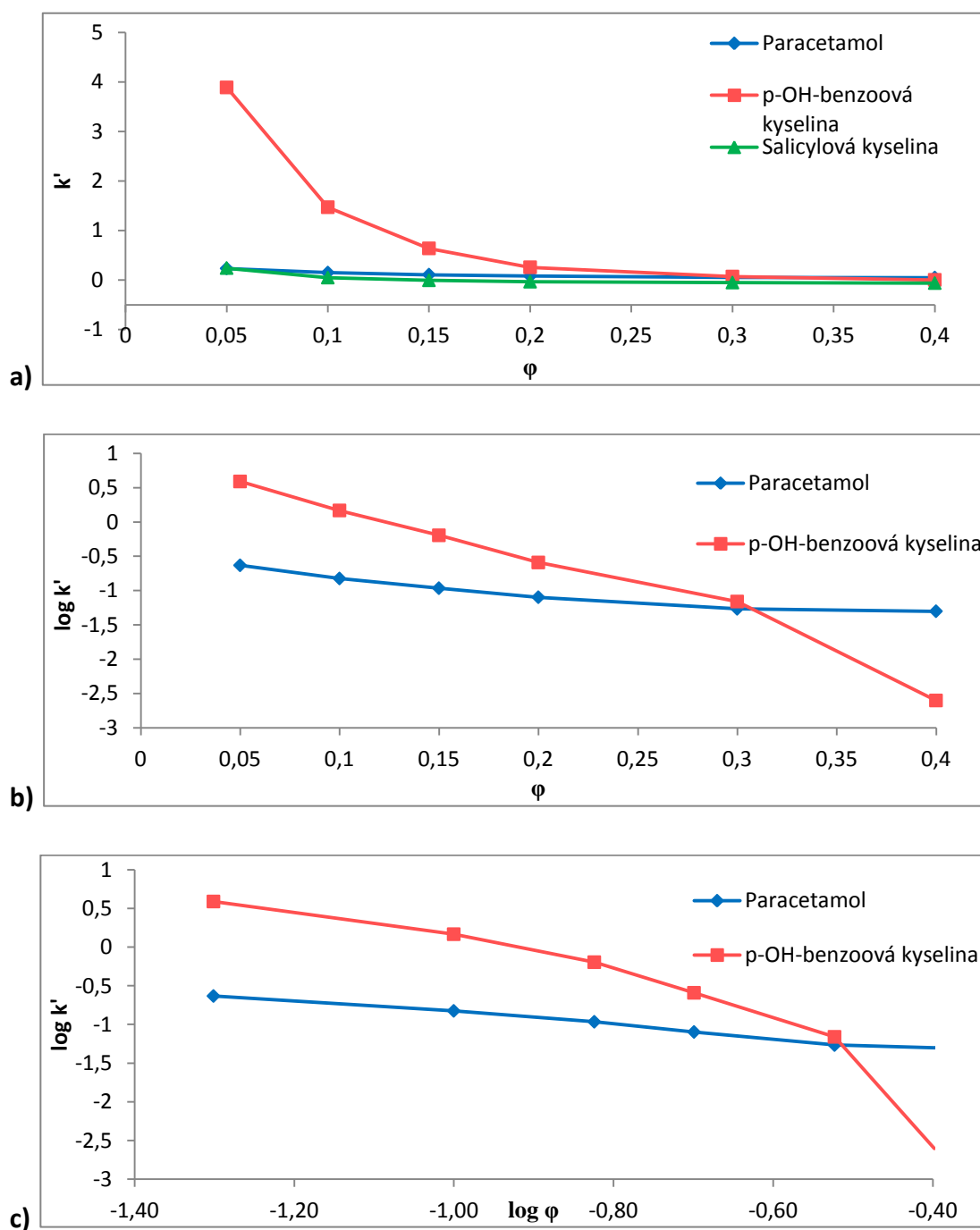
5.2.1. Kyselé látky - Ascentis HILIC Express (pH = 3,8)



Obrázek 24: a)závislost lin-lin, b)závislost log-lin, c)závislost log-log.

Při koncentraci vodné složky nižší než 20 % byl průběh křivky závislosti log-log (Obr. 24 c) lineární, což vypovídá o adsorpčním procesu retence. Kyselina salicylová ($\log P = 2,011$) byla na této koloně velmi špatně zadržována, její retenční čas byl menší než mrtvý objem. Nejvíce zadržovanou látkou byla kyselina p-OH-benzoová ($\log P = 1,401$).

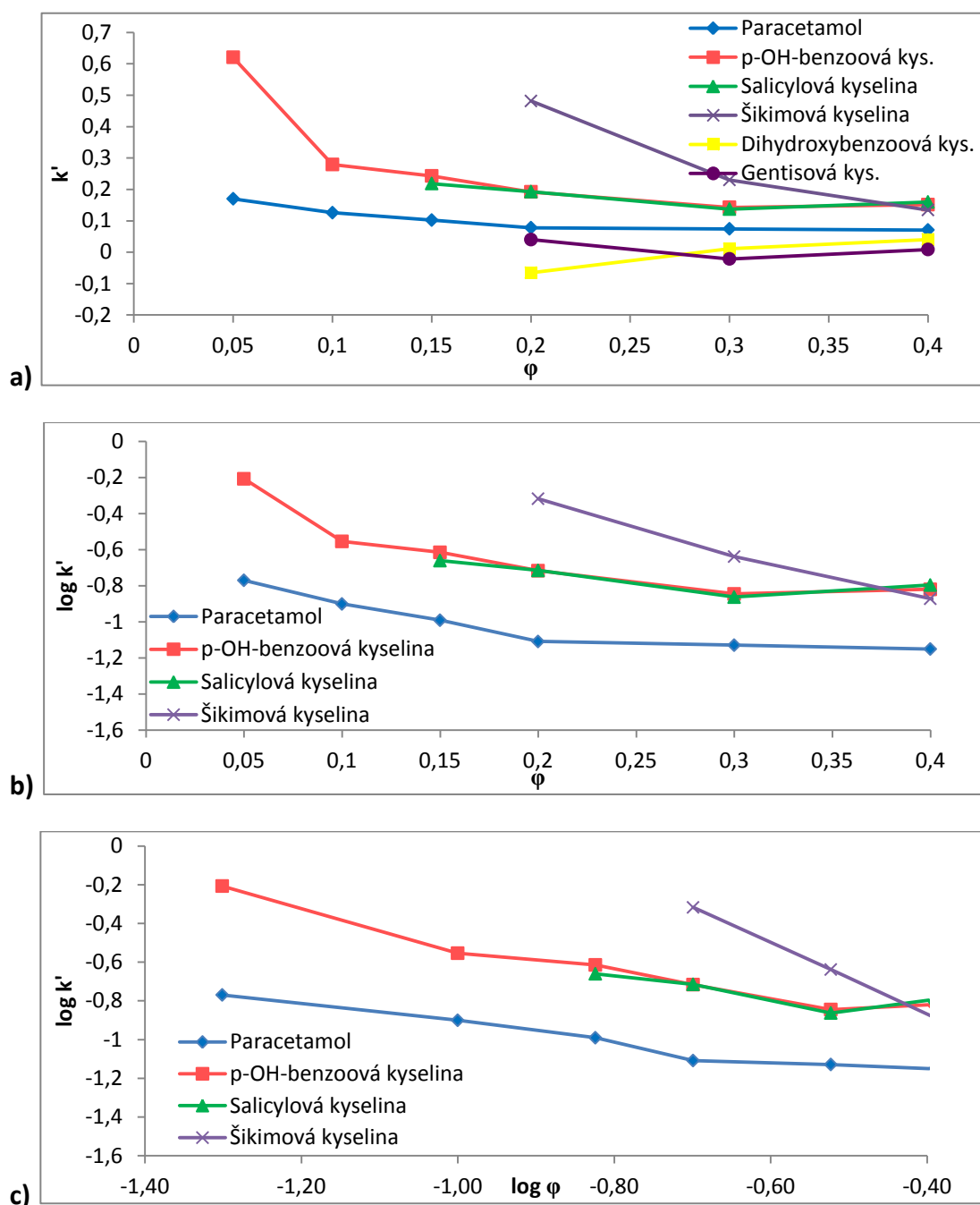
5.2.1. Kyselé látky - Ascentis HILIC Express (pH = 6,8)



Obrázek 25: a)závislost lin-lin, b)závislost log-lin, c)závislost log-log.

Při koncentraci vodné složky nižší než 20 % byl průběh křivky závislosti log-lin kyseliny p-OH-benzoové lineární, což indikuje převahu rozdělovacího mechanismu retence (Obr. 25 b). U paracetamolu se jedná pravděpodobně o smíšený mechanismus retence (Obr. 25 b, c). Kyselina salicylová byla opět velmi špatně zadržována.

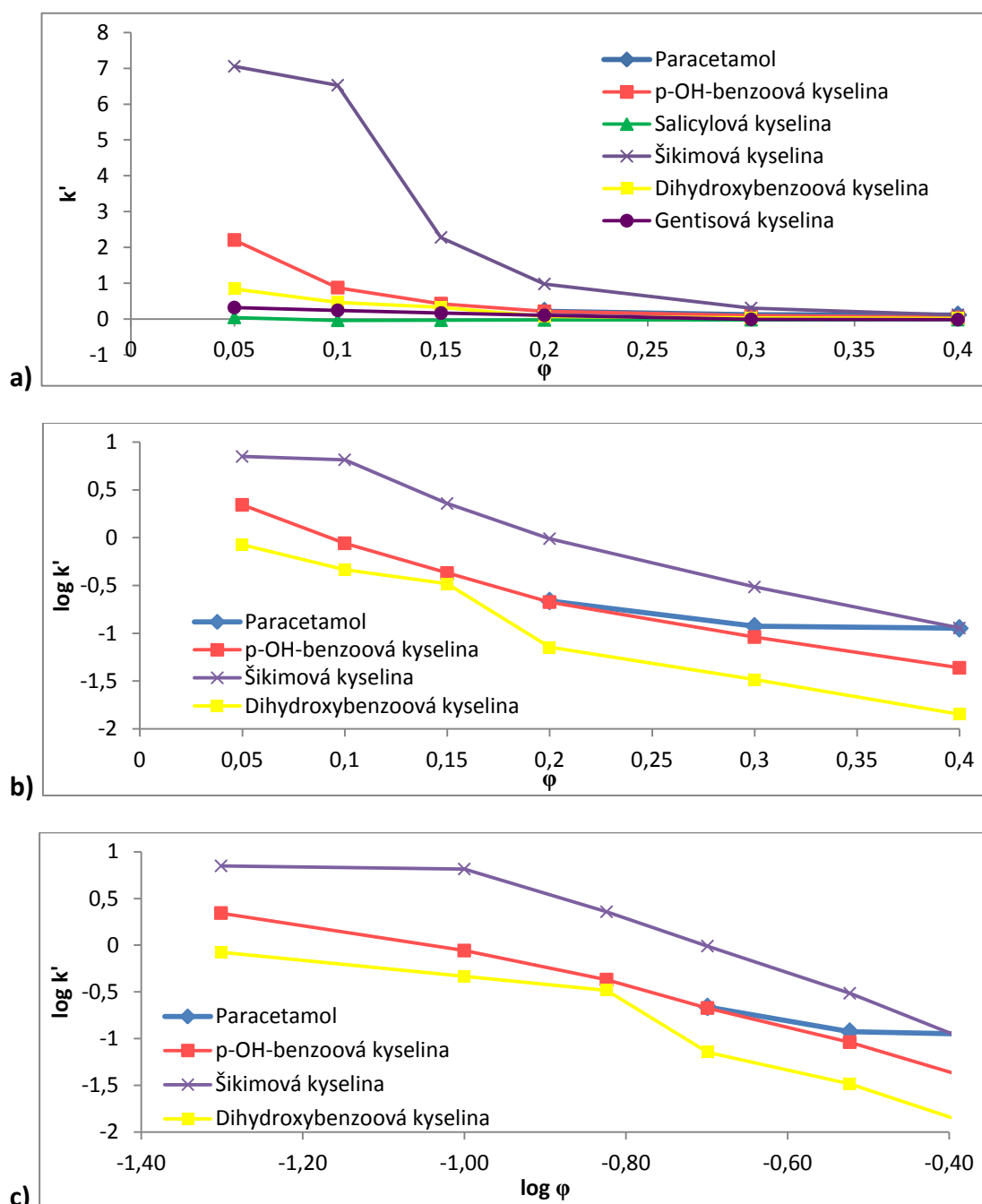
5.2.1. Kyselé látky – ACQUITY UPLC BEH HILIC (pH = 3,8)



Obrázek 26: a) závislost lin-lin, b) závislost log-lin, c) závislost log-log.

Při koncentraci vody nižší než 20 % byly píky kyseliny gentisové, šikimové a dihydroxybenzoové příliš rozmyté (Obr. 26 a). U paracetamolu a kyseliny p-OH-benzoové se jednalo pravděpodobně o smíšený mechanismus retence (Obr. 26 b, c). U kyseliny salicylové byla závislost log-lin při koncentraci vodné složky nižší než 70 % lineární, což indikuje převahu rozdělovacího mechanismu (Obr. 26 b).

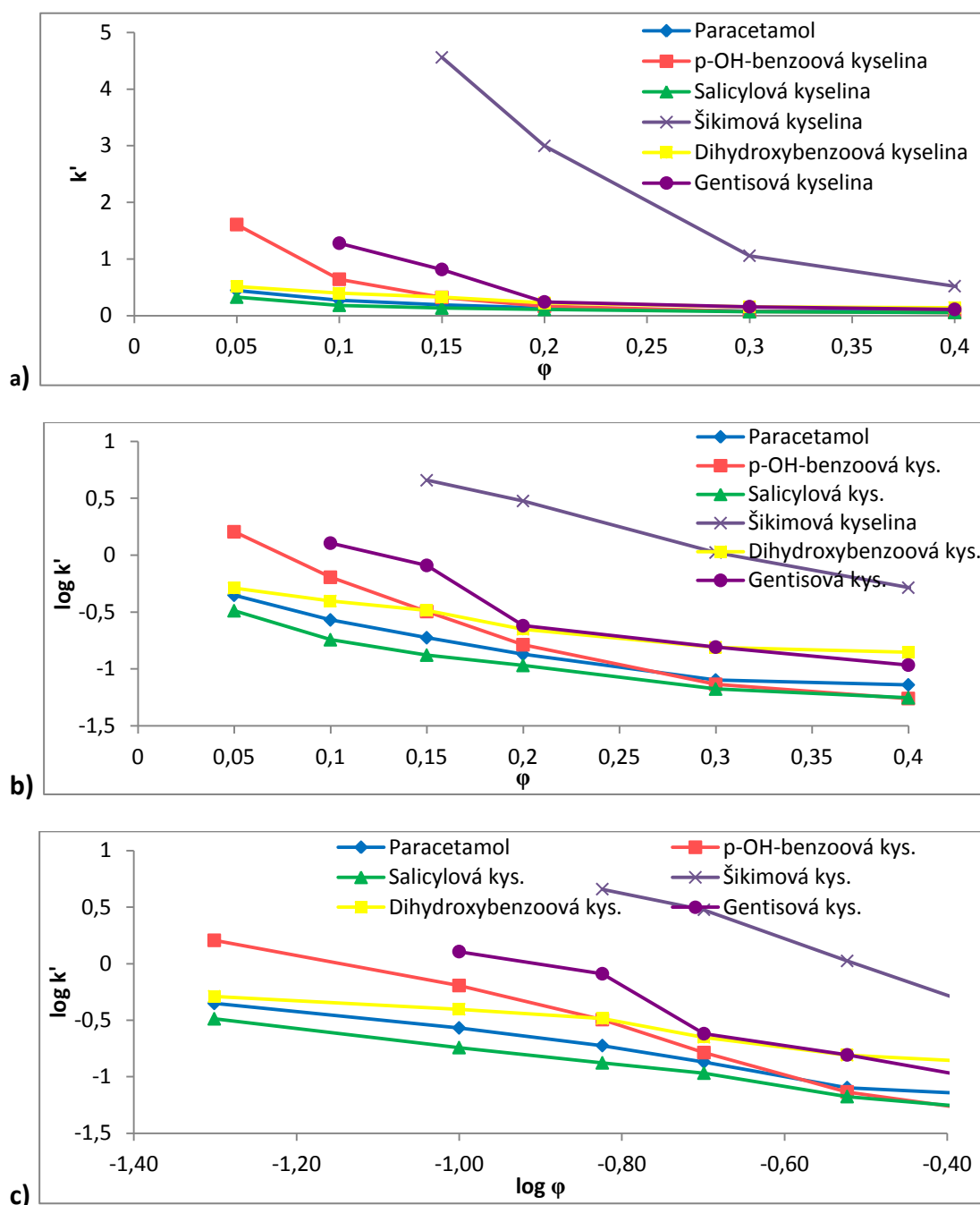
5.2.1. Kyselé látky – ACQUITY UPLC BEH HILIC (pH = 6,8)



Obrázek 27: a) závislost lin-lin, b) závislost log-lin, c) závislost log-log.

Při pH = 6,8 byly píky paracetamolu při nižší koncentraci vody než 20 % příliš rozmyté (Obr. 27 a). U kyseliny dihydroxybenzoové byl průběh křivky závislosti log-log při koncentraci vody nižší než 20 % lineární, což vypovídá o adsorpčním procesu retence (Obr. 27 c). Kyselina salicylová a gentisová byly velmi špatně zadržovány, jejich retenční časy byly nižší než mrtvý objem (Obr. 27 a).

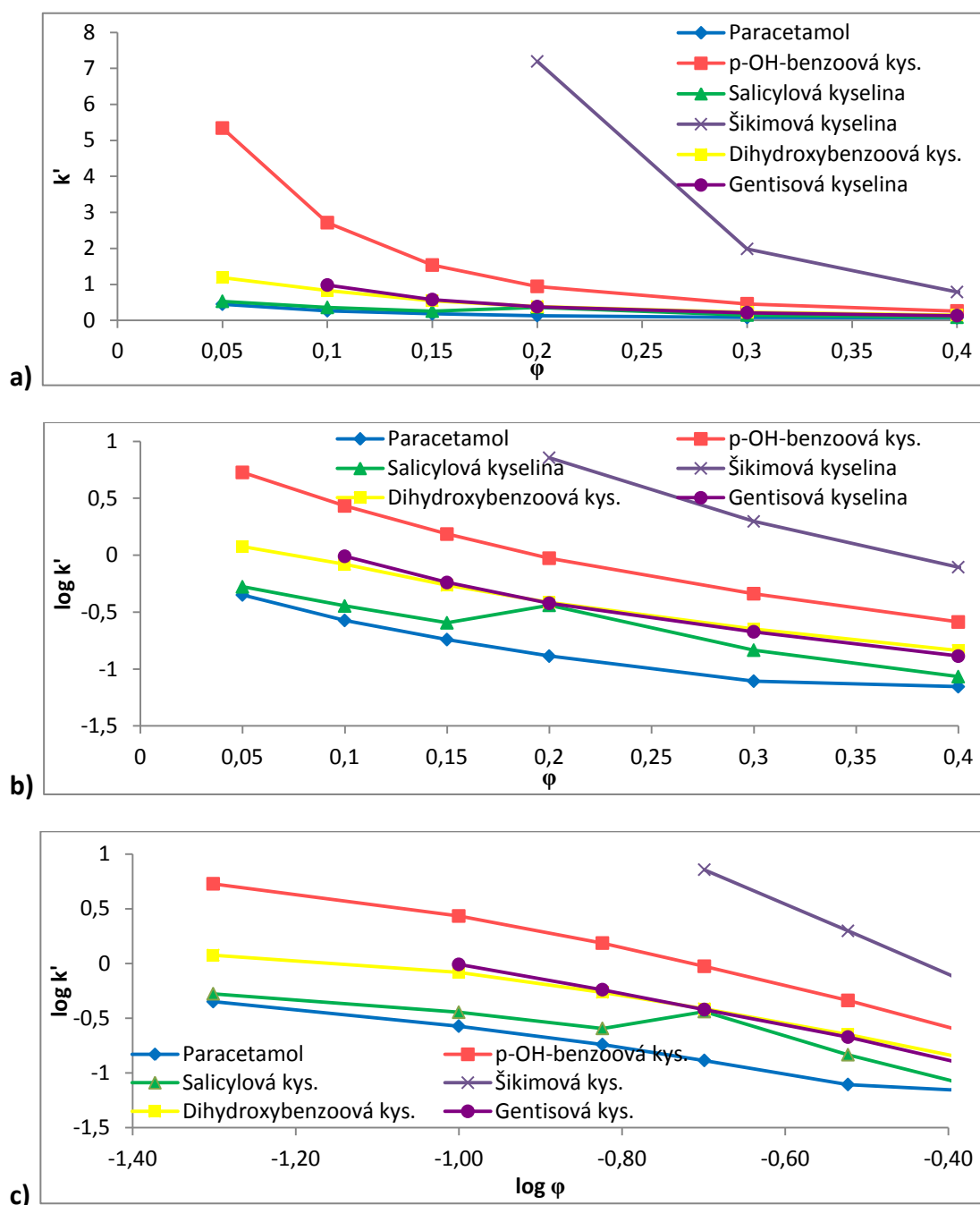
5.2.1. Kyselé látky – ACQUITY UPLC BEH AMIDE (pH = 3,8)



Obrázek 28: a)závislost lin-lin, b)závislost log-lin, c)závislost log-log.

Kyselina salicylová byla na této koloně nejlépe zadržována ve srovnání s předchozími kolonami (Obr. 28 a). Průběh křivky závislosti log-lin a log-log byl při koncentraci vodné složky nižší než 20 % lineární, což vypovídá o smíšeném procesu retence (Obr. 28 b, c).

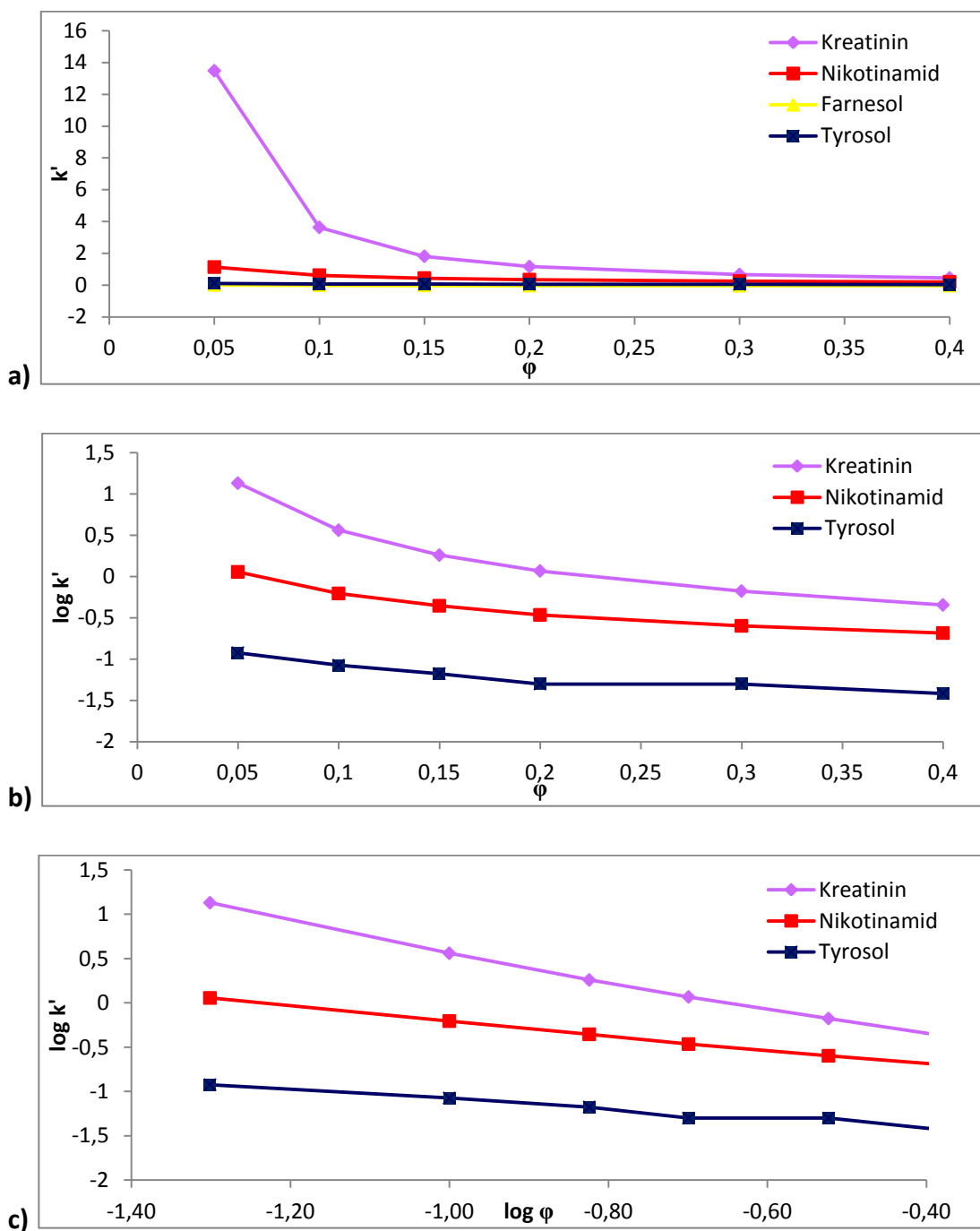
5.2.1. Kyselé látky – ACQUITY UPLC BEH AMIDE (pH = 6,8)



Obrázek 29: a) závislost lin-lin, b) závislost log-lin, c) závislost log-log.

Kyselina salicylová byla opět zadržována lépe než na předchozích kolonách. Průběh křivky závislosti log-lin i log-log byl lineární, což vypovídá o smíšeném mechanismu retence (Obr. 29 b, c). U kyseliny šikimové byly píky při nižších koncentracích vodné složky příliš rozmyté.

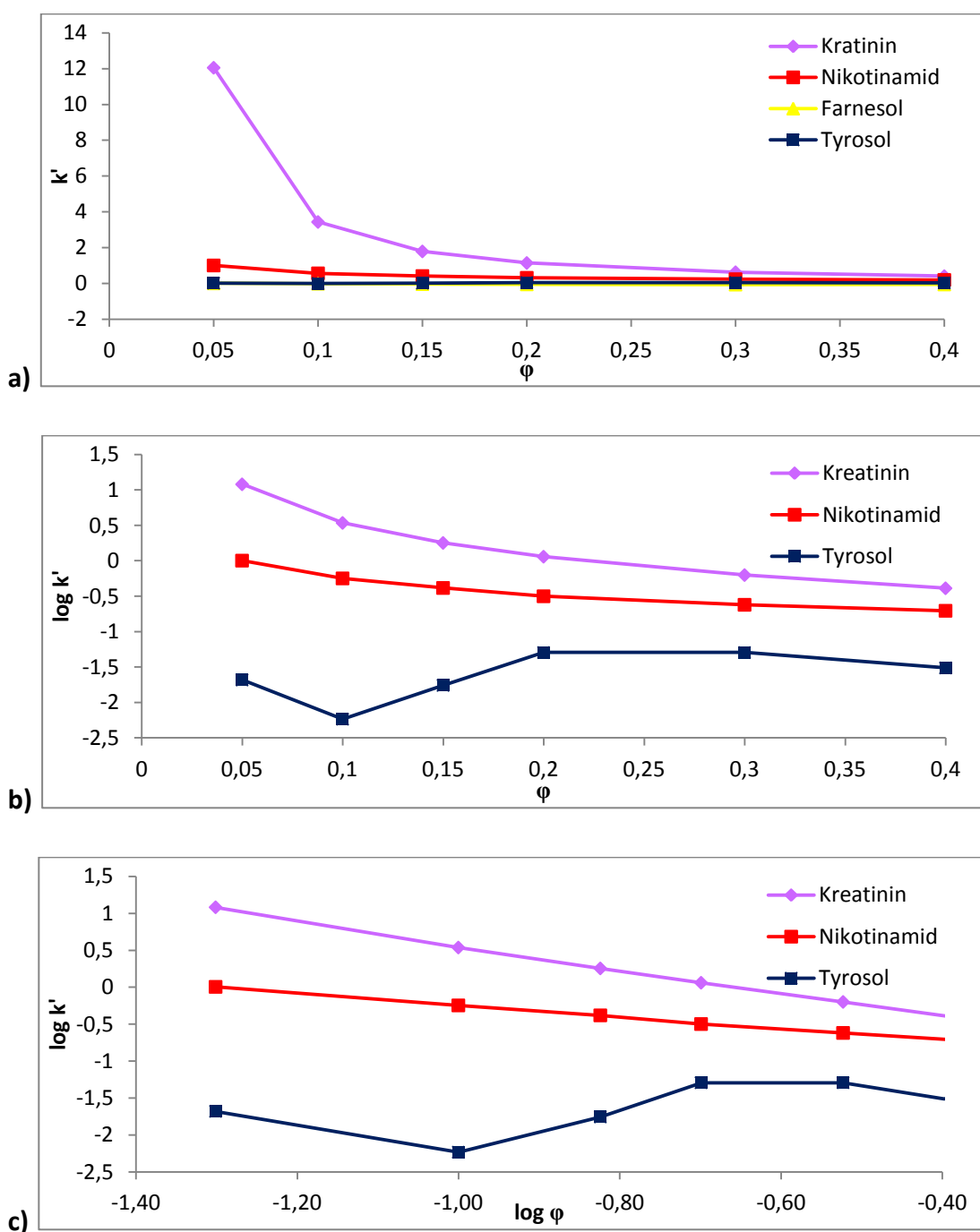
5.2.2. Neutrální látky – Ascentis Express HILIC (pH = 3,8)



Obrázek 30: a)závislost lin-lin, b)závislost log-lin, c)závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-log byl u kreatininu, nikotinamidu a tyrosolu lineární, což vypovídá o adsorpčním procesu retence (Obr. 30 c). Farnesol byl velmi špatně zadržován. Hodnoty jeho retenčního času byly nižší než mrtvý objem, což je pravděpodobně dáno vysokou hodnotou $\log P = 4,828$.

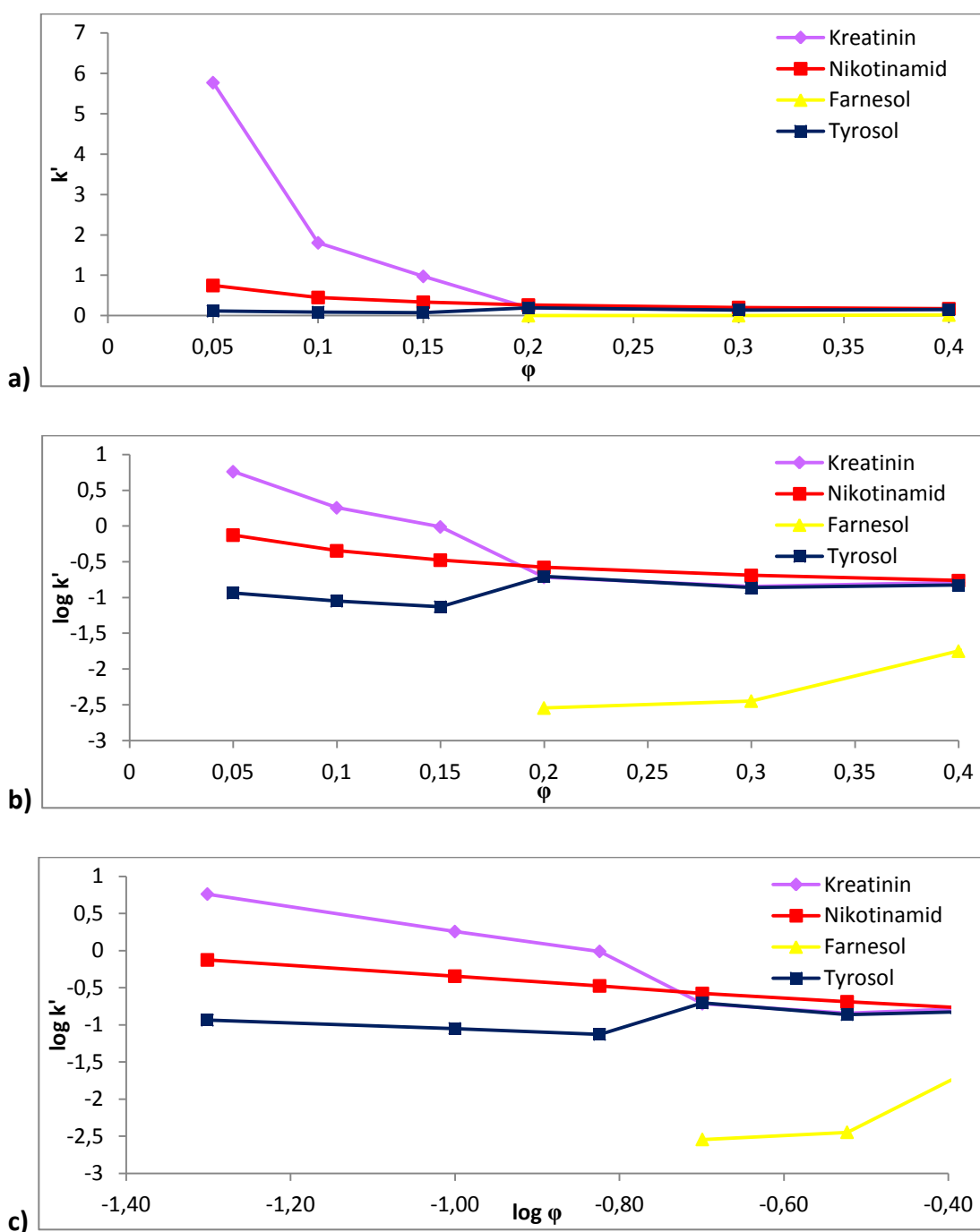
5.2.2. Neutrální látky – Ascentis Express HILIC (pH = 6,8)



Obrázek 31: a)závislost lin-lin, b)závislost log-lin, c)závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-log byl u kreatininu a nikotinamidu lineární, což vypovídá o adsorpčním procesu retence (Obr. 31 c). Farnesol byl velmi špatně zadržován. Hodnoty jeho retenčního času byly nižší než mrtvý objem, což je pravděpodobně dáno vysokou hodnotou $\log P = 4,828$. Farnesol byl pro tuto studii nevhodně zvolenou látkou.

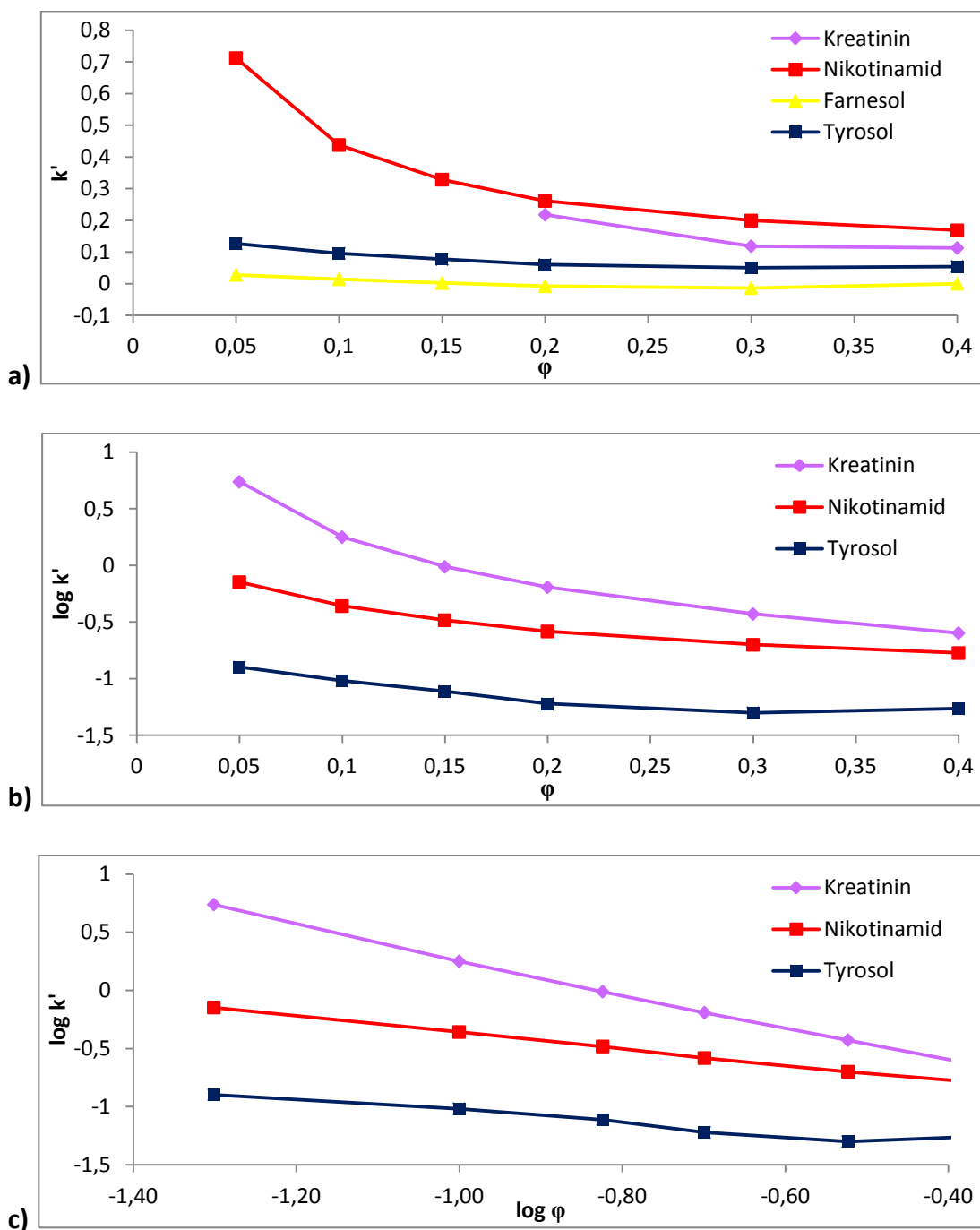
5.2.2. Neutrální látky – ACQUITY UPLC BEH HILIC (pH = 3,8)



Obrázek 32: a)závislost lin-lin, b)závislost log-lin, c)závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-lin i log-log byl při koncentraci vodné složky nižší než 20 % u kreatininu, nikotinamidu a tyrosolu lineární, což vypovídá o smíšeném procesu retence (Obr. 32 b, c). Farnesol byl zadržován o něco lépe než na koloně Ascentis Express HILIC (Obr. 32 a).

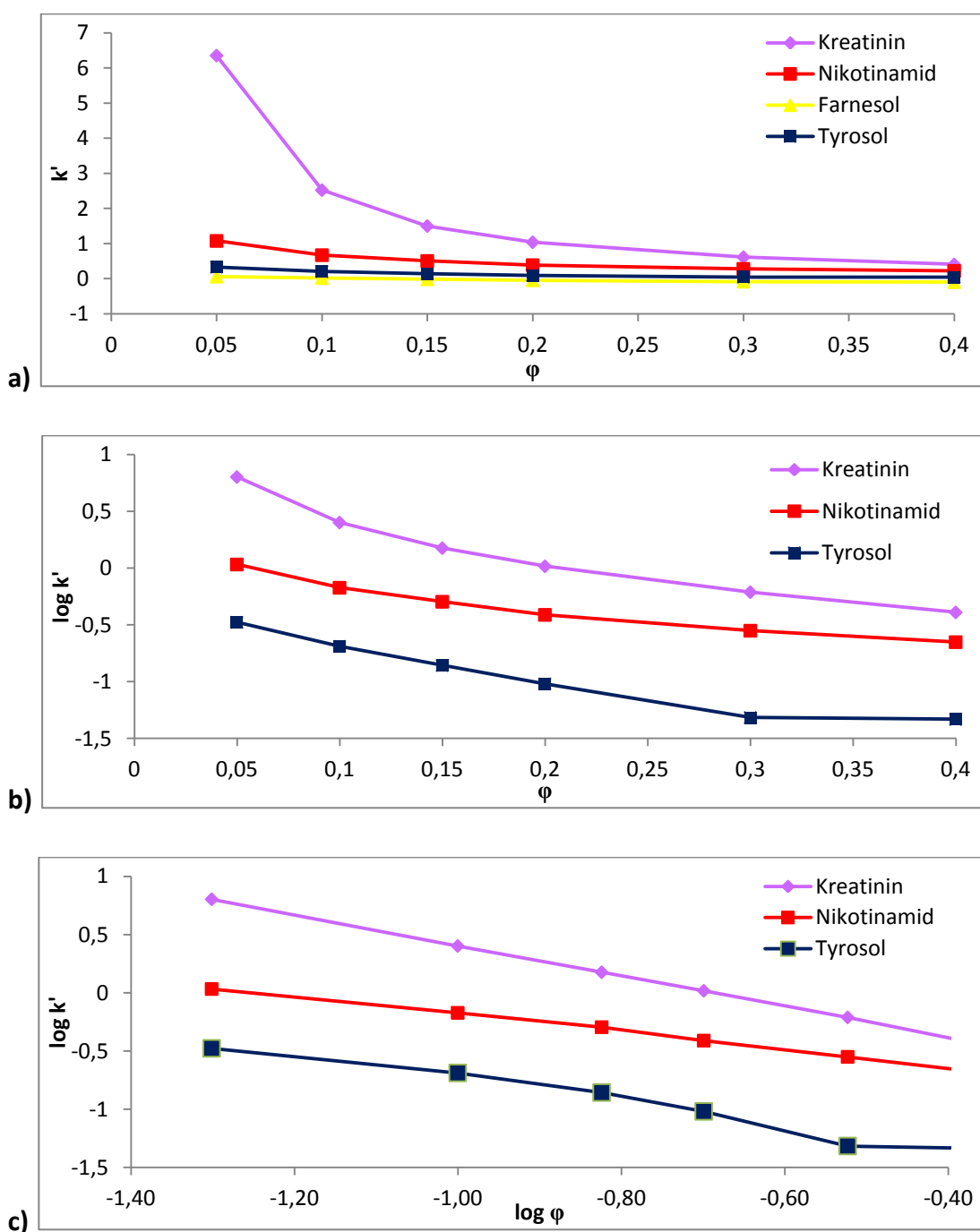
5.2.2. Neutrální látky – ACQUITY UPLC BEH HILIC (pH = 6,8)



Obrázek 33: a)závislost lin-lin, b)závislost log-lin, c)závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-lin i log-log byl u nikotinamidu a tyrosolu lineární, což vypovídá o adsorpčním procesu retence (Obr. 33 b, c). Hodnoty retenčního času farnesolu byly opět nižší než mrtvý objem.

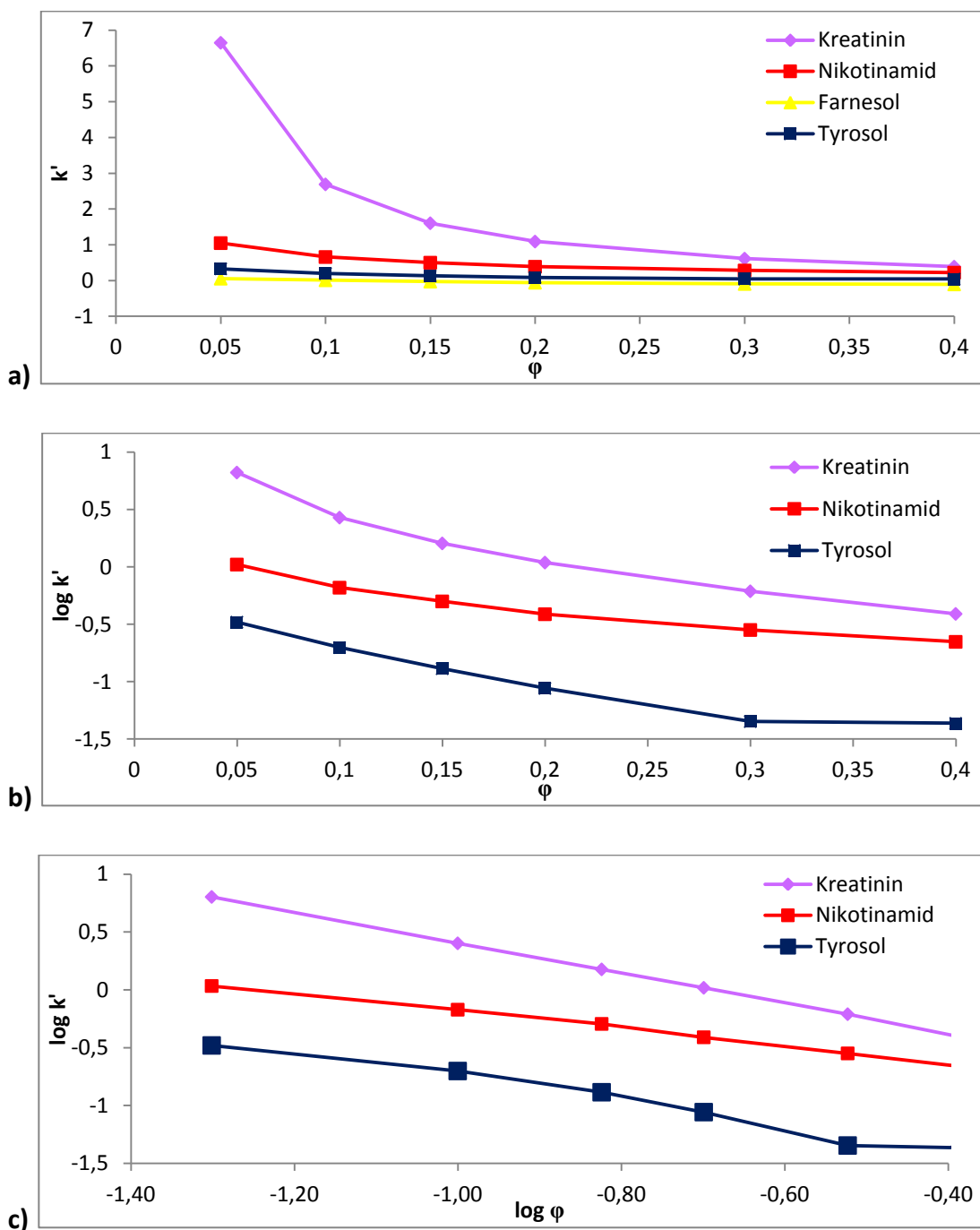
5.2.2. Neutrální látky – ACQUITY UPLC BEH AMIDE (pH = 3,8)



Obrázek 34: a)závislost lin-lin, b)závislost log-lin, c)závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-lin i log-log byl u nikotinamidu a tyrosolu lineární, což vypovídá o smíšeném procesu retence (Obr. 34 b, c). Farnesol byl opět velmi špatně zadržován. Nejvíce zadržovanou látkou byl kreatinin (Obr. 34 a).

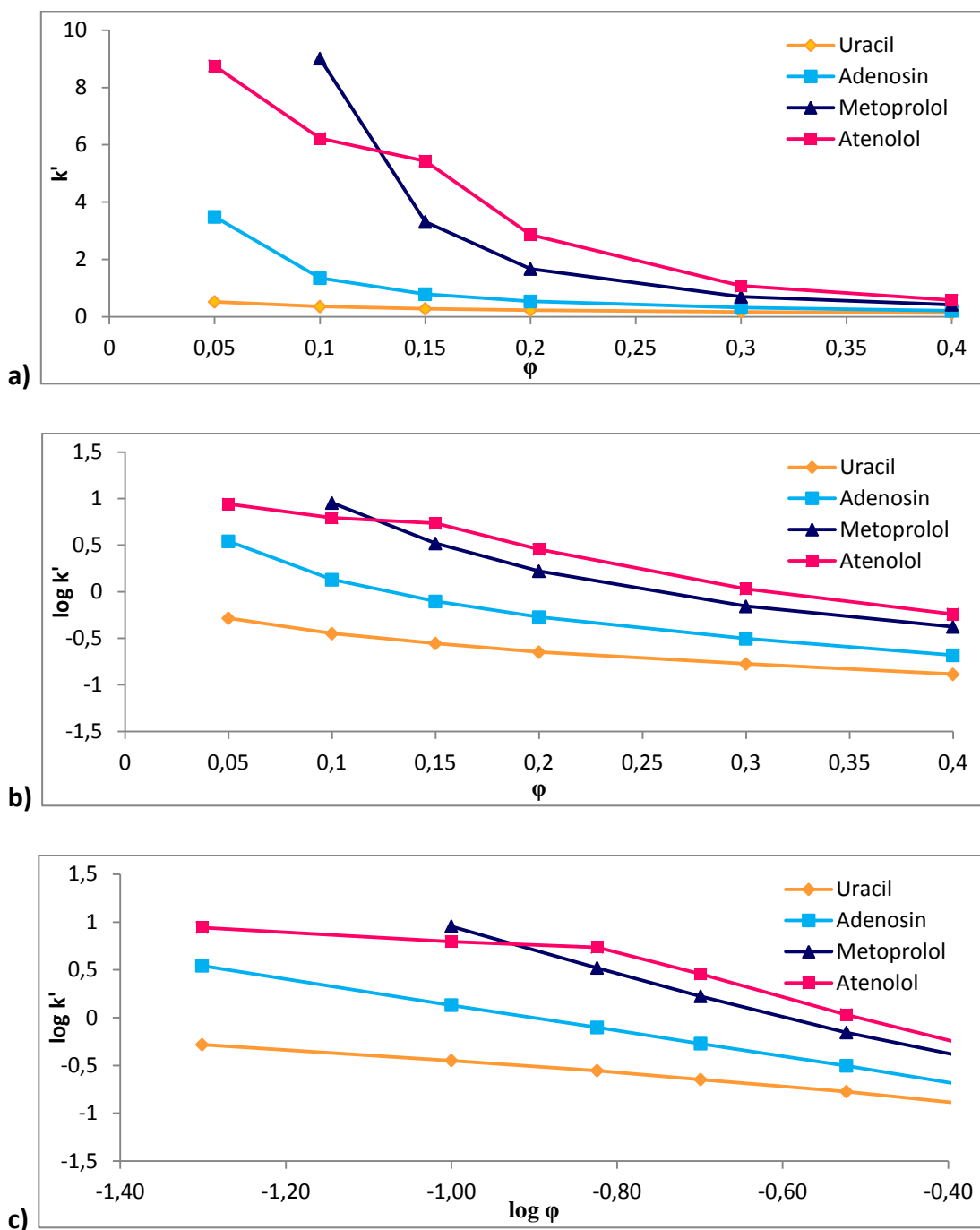
5.2.2. Neutrální látky – ACQUITY UPLC BEH AMIDE (pH=6,8)



Obrázek 35: a)závislost lin-lin, b)závislost log-lin, c)závislost log-log.

Průběh křivky závislosti \log -lin i \log -log byl u kreatininu, nikotinamidu a tyrosolu lineární, což vypovídá o smíšeném procesu retence (Obr. 35 c). Farnesol byl opět velmi špatně zadržován. Nejvíce zadržovanou látkou byl kreatinin (Obr. 35 a).

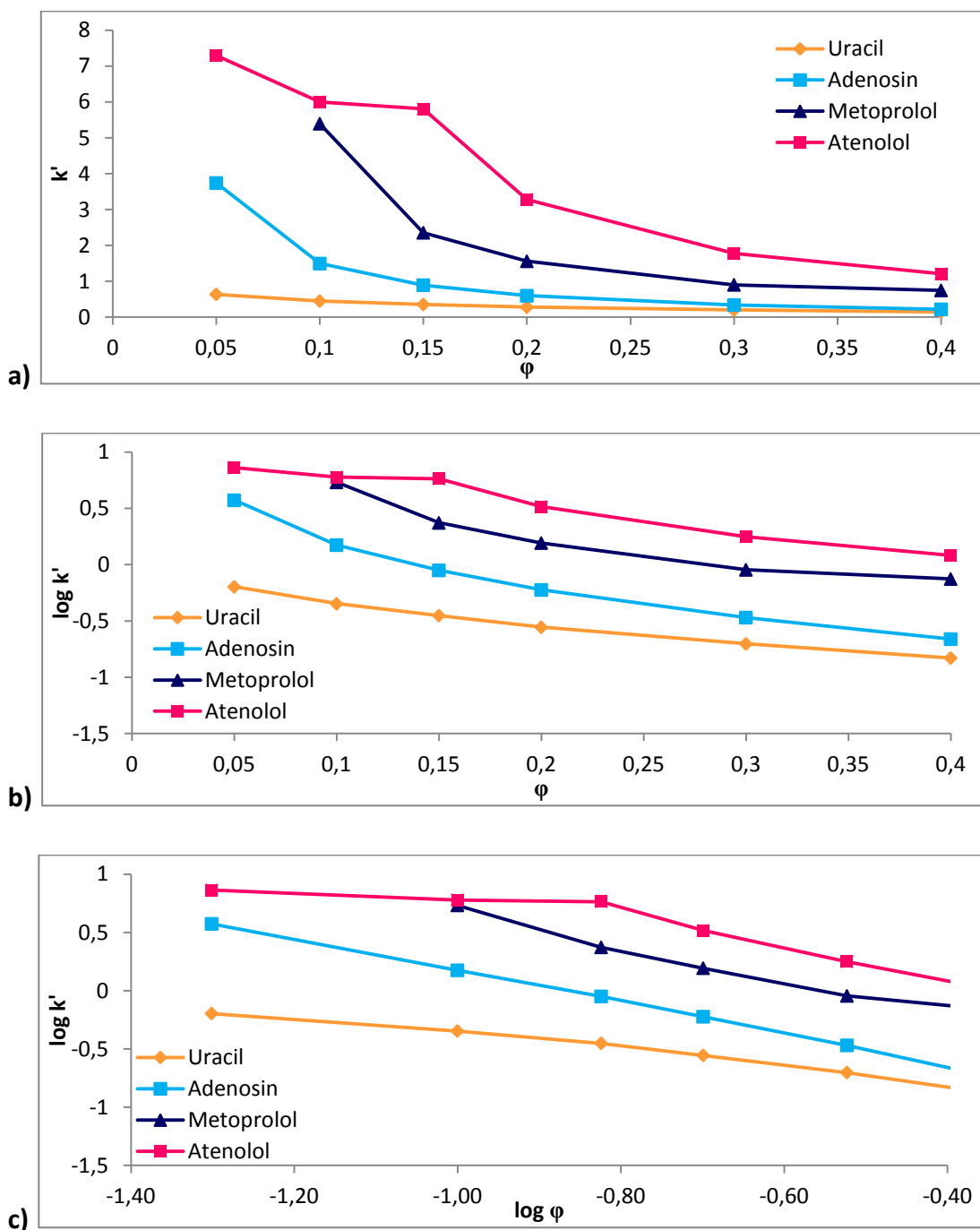
5.2.3. Bazické látky – Ascentis Express HILIC (pH = 3,8)



Obrázek 36: a) závislost lin-lin, b) závislost log-lin, c) závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-log byl u adenosinu, uracilu a metoprololu lineární, což vypovídá o adsorpčním mechanismu retence (Obr. 36 c). U metoprololu byly píky při nízkém podílu vody v mobilní fázi příliš rozmyté (Obr. 36 a).

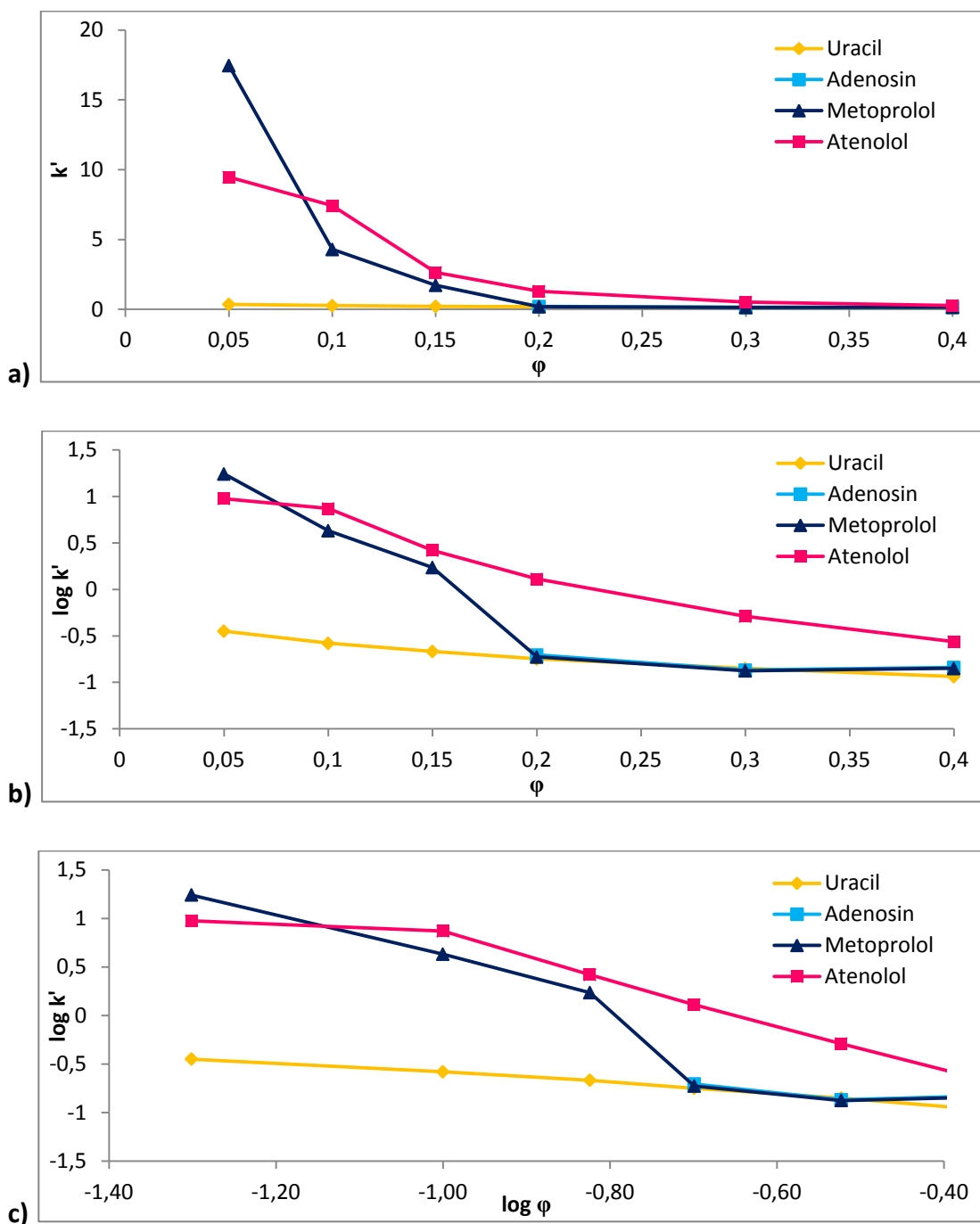
5.2.3. Bazické látky – Ascentis Express HILIC (pH = 6,8)



Obrázek 37: a) závislost lin-lin, b) závislost log-lin, c) závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-log byl u adenosinu a uracilu lineární, což vypovídá o adsorpčním mechanismu retence (Obr. 37 c). U metoprololu byly píky při nízkém podílu vody v mobilní fázi příliš rozmyté (Obr. 37 a).

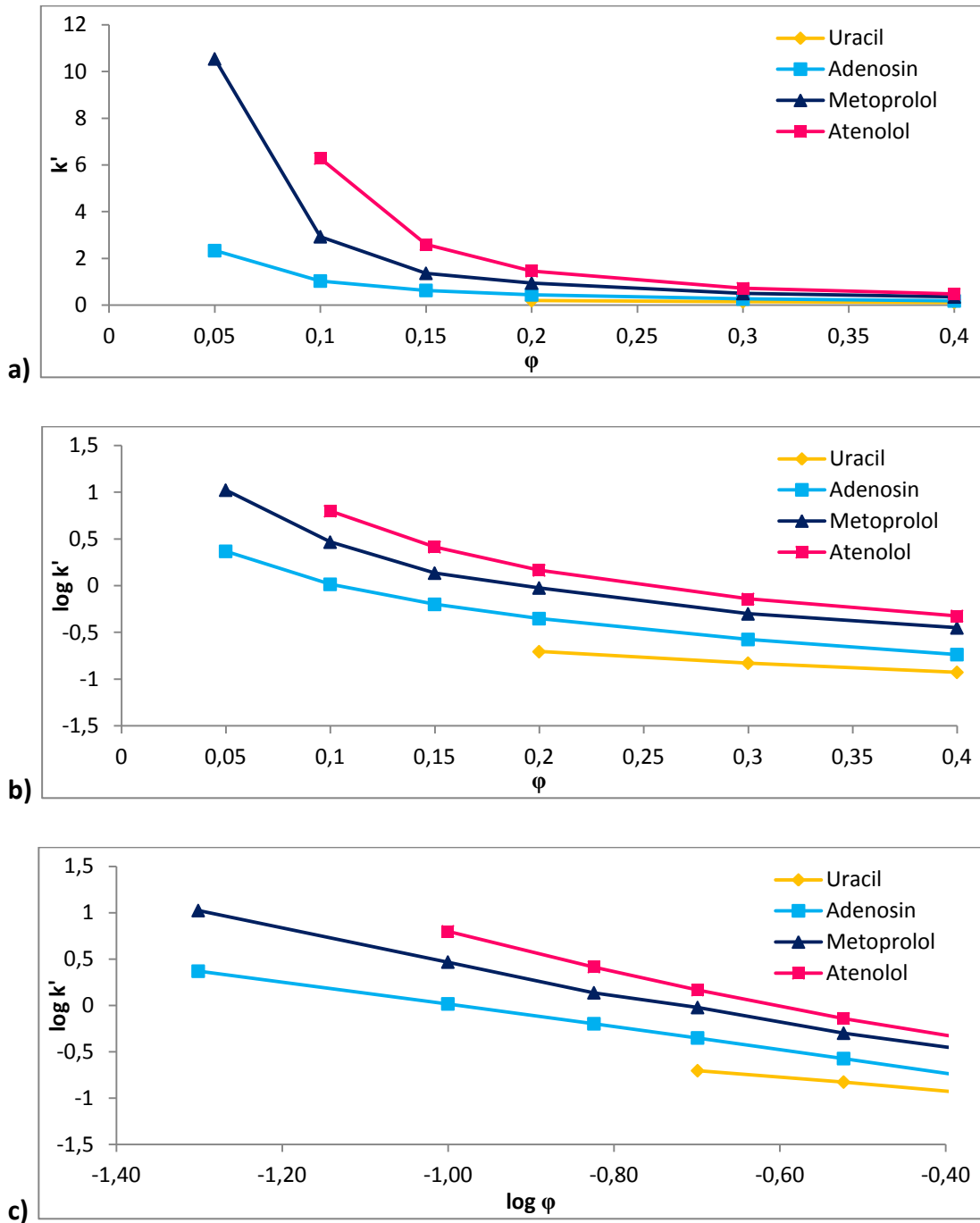
5.2.3. Bazické látky – ACQUITY UPLC BEH HILIC (pH = 3,8)



Obrázek 38: a) závislost lin-lin, b) závislost log-lin, c) závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-log byl u uracilu a metoprololu lineární, což vypovídá o adsorpčním mechanismu retence (Obr. 38 c). Píky adenosinu byly při nižších koncentracích vody v mobilní fázi příliš rozmyté.

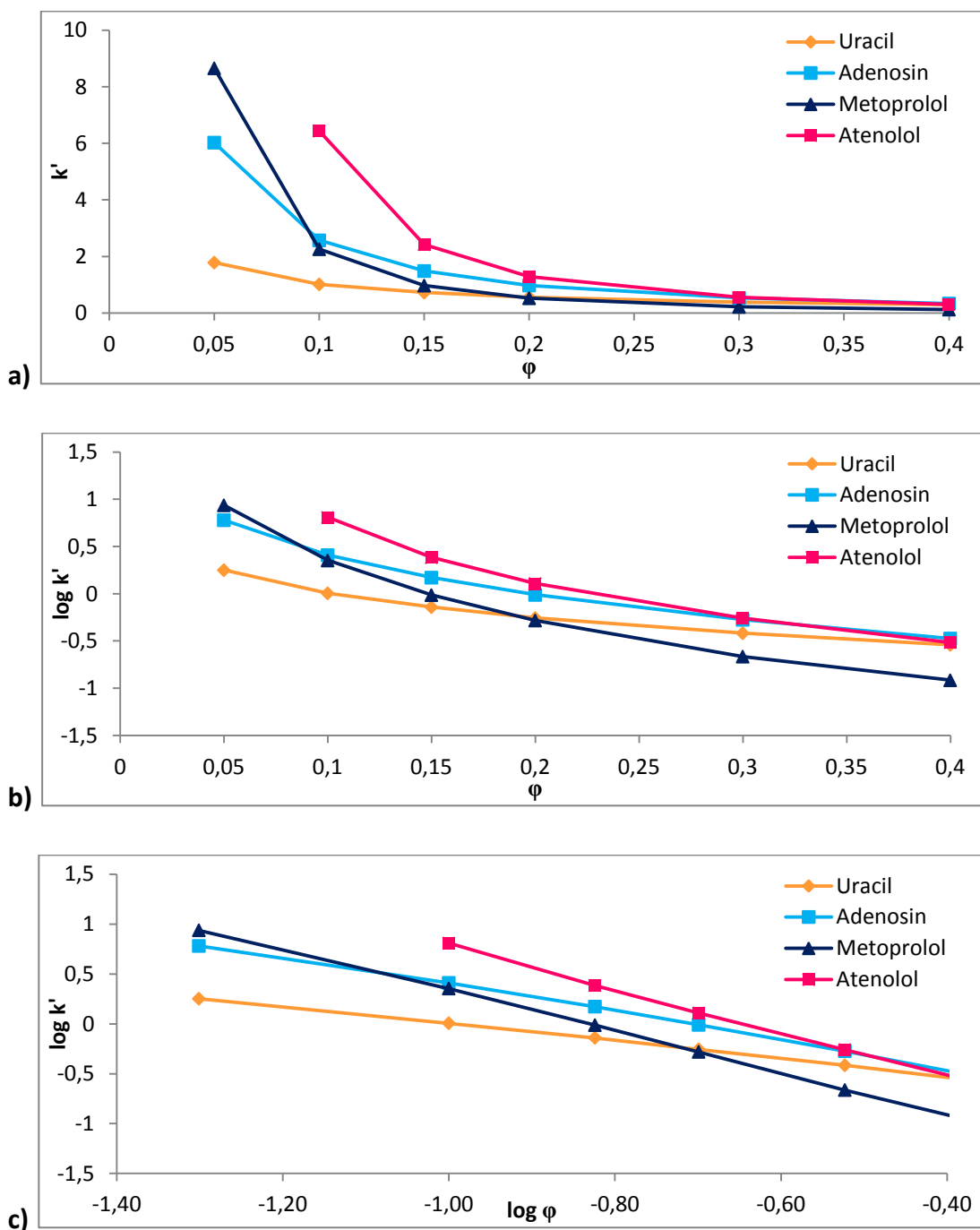
5.2.3. Bazické látky – ACQUITY UPLC BEH HILIC (pH = 6,8)



Obrázek 39: a) závislost lin-lin, b) závislost log-lin, c) závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-log byl u adenosinu, metoprololu a atenololu lineární, což vypovídá o adsorpčním mechanismu retence (Obr. 39 c). Píky uracilu byly při nižších koncentracích vody v mobilní fázi příliš rozmyté.

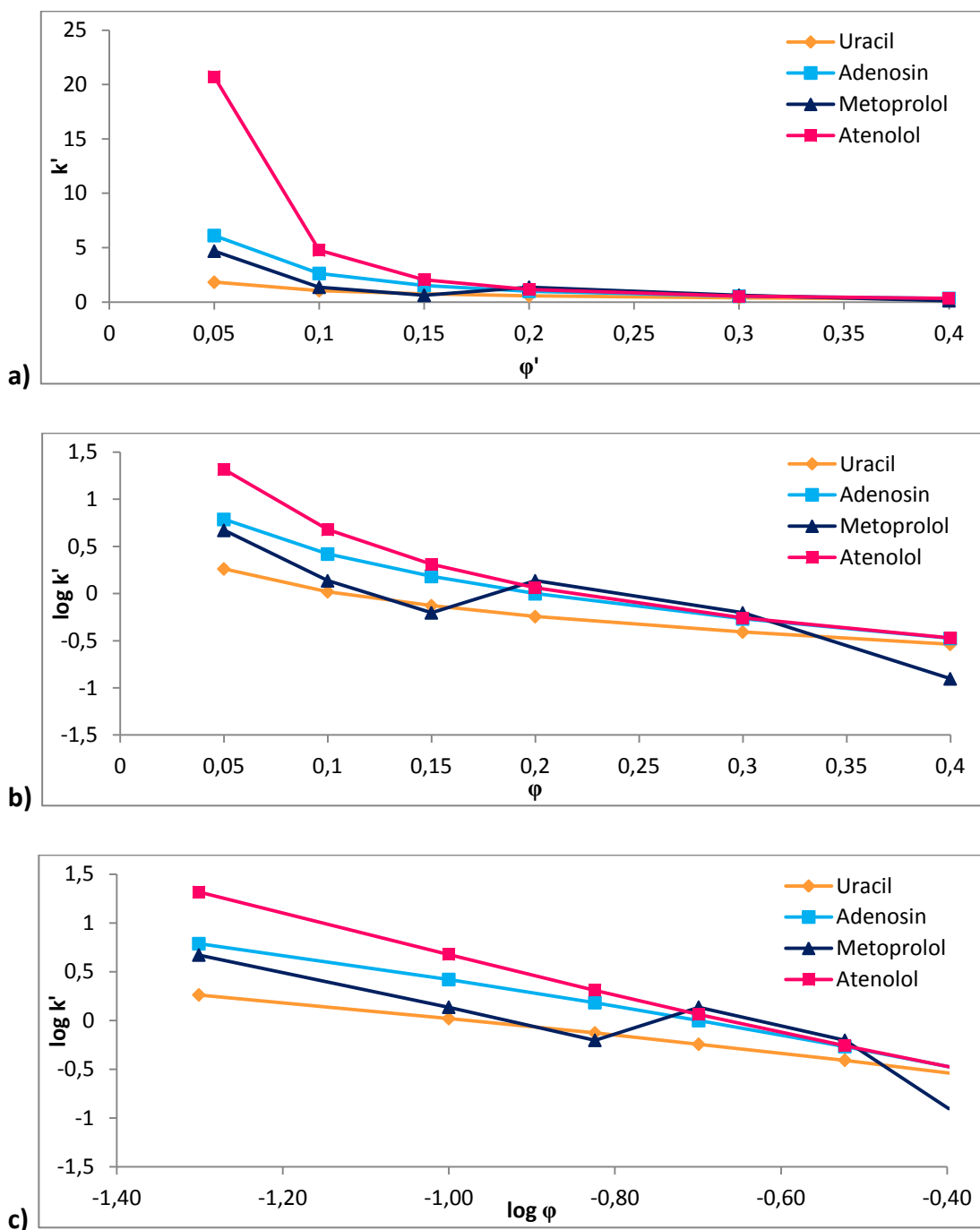
5.2.3. Bazické látky – ACQUITY UPLC BEH AMIDE (pH = 3,8)



Obrázek 40: a) závislost lin-lin, b) závislost log-lin, c) závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-log byl u adenosinu, metoprololu, atenololu a uracilu lineární, což vypovídá o adsorpčním mechanismu retence (Obr. 40 c). Uracil byl zadržován lépe než na koloně ACQUITY UPLC BEH HILIC (Obr. 40 a).

5.2.3. Bazické látky – ACQUITY UPLC BEH AMIDE (pH = 6,8)



Obrázek 41: a)závislost lin-lin, b)závislost log-lin, c)závislost log-log.

Průběh křivky závislosti log-log byl u adenosinu, metoprololu, atenololu a uracilu lineární, což vypovídá o adsorpčním mechanismu retence (Obr. 41 c). Odchylna u metoprololu (Obr. 41 c) je pravděpodobně způsobena chybou v měření.

6. Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem HILIC mechanismu tří stacionárních fází – Ascentis HILIC Express, ACQUITY BEH HILIC a ACQUITY BEH AMIDE. Kolony byly hodnoceny z hlediska selektivity a retence jednotlivých skupin analytů. Byl sledován vliv složení mobilní fáze a vliv pH.

Při porovnání selektivity kolon Ascentis HILIC Express a ACQUITY BEH HILIC byl zaznamenán rozdíl v selektivě pouze u pH = 6,8 při koncentraci vodné složky 15%. V ostatních případech neměla hodnota pH na selektivitu vliv. Hodnoty s^2 jsou zaznamenány v tabulce 16.

Podmínky	Hodnota s^2
pH = 3,8; koncentrace vodné složky 15 %	0,073
pH = 6,8; koncentrace vodné složky 15 %	0,025
pH = 3,8; koncentrace vodné složky 10%	0,028
pH= 6,8; koncentrace vodné složky 10%	0,145

Tabulka 16: Porovnání selektivity kolon Ascentis HILIC Express a ACQUITY UPLC BEH HILIC při různých podmínkách.

U kolon ACQUITY BEH HILIC a ACQUITY BEH AMIDE byl rozdíl v selektivě velmi výrazný, zvláště při pH = 6,8. Kolonu ACQUITY BEH AMIDE tvoří BEH částice modifikované trifunkčně vázaným amidem. Rozdíl v selektivě kolon se dal předpokládat. Hodnoty s^2 jsou zaznamenány v tabulce 17.

Podmínky	Hodnota s^2
pH = 3,8; koncentrace vodné složky 15 %	0,183
pH = 6,8; koncentrace vodné složky 15 %	0,500
pH = 3,8; koncentrace vodné složky 10%	0,097
pH= 6,8; koncentrace vodné složky 10%	0,321

Tabulka 17: Porovnání selektivity kolon ACQUITY UPLC BEH AMIDE a ACQUITY UPLC BEH HILIC při různých podmínkách.

U kolony Ascentis Express HILIC neměla hodnota pH na selektivitu téměř žádný vliv kromě atenololu a metoprololu. Selektivita kolony ACQUITY UPLC BEH HILIC byla při pH = 3,8 a pH = 6,8 srovnatelná, hodnota pH neměla na selektivitu téměř žádný vliv. U kolony ACQUITY UPLC BEH AMIDE byla selektivita při pH = 3,8 a pH = 6,8 velmi rozdílná. Hodnoty s^2 jsou zaznamenány v tabulce 18.

Kolona	Hodnota s^2
Ascentis Express HILIC	0,048
ACQUITY UPLC BEH HILIC	0,054
ACQUITY UPLC BEH AMIDE	0,286

Tabulka 18: Porovnání selektivity kolon při pH = 3,8 a pH = 6,8 při koncentraci vodné složky 15 %.

Problematickými látkami byly kyselina salicylová ($\log P = 2,011$) a farnesol ($\log P = 4,828$). Na všech kolonách byly velmi málo zadržovány a jejich retenční časy byly nižší než mrtvý objem. Tyto dvě byly pro tuto studii nevhodně zvolené.

Naopak metoprolol ($\log P = 1,632$) a atenolol ($\log P = 0,335$) byly zadržovány příliš, jejich retenční časy byly pravděpodobně vyšší než 20 min. Nejvhodnější kolonou pro jejich separaci se jevila kolona ACQUITY BEH AMIDE. Tato kolona je tvořena BEH částicemi modifikovanými trifunkčně vázaným amidem a je vhodná pro separaci bazických látek.

U většiny látek převažoval smíšený mechanismus retence. Pro obecnější závěr o mechanismu retence u jednotlivých skupin látek je zapotřebí širších měření a většího spektra měřených látek.

Literatura

- [1] J. Vacek, L. Onofrejevová, B. Klejdus, V. Kubáň, *Chem. listy* 103 (2009) 381-385.
- [2] D. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. Veuthey, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1836-1848.
- [3] E. S. Grumbach, D. Wagrowski-Diehl, J. R. Mazzeo, B. Alden, P. C. Iraneta, *LCGC North America* 22 (2004) 1010-1023.
- [4] P. Jandera, *Chemagazín* 2 (2011) 8-9.
- [5] W. Jian, R. Edom, Y. XU, N. Weng, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 681-697.
- [6] http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/detail_page_images/atlantis_hilic_detail_1.gif (02/2012).
- [7] P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784-1821.
- [8] D. Sýkora, E. Tesařová, M. Vosmanská, M. Zvolánková, *Chem. listy* 101 (2007) 190-199.
- [9] <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10009386> (02/2012).
- [10] K. J. Fountain, J. Xu, D. M. Diehl, D. Morrison, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 740-751.
- [11] <http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=176001092> (02/2012).
- [12] Ascentis® Express HILIC Care & Use Sheet.
- [13] F. Švec, *Chem. Listy* 103 (2009) 266-270.
- [14] J. M. Cunliffe, T. D. Maloney, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3104-3109.
- [15] R. W. Brice, X. Zhang, L. A. Colón, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2723-2731.
- [16] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=20356023> (01/2012).
- [17] X Bridge Amide Columns (<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003232en.pdf>, 02/2012).
- [18] P. Jandera, *Analytica Chimica Acta* 692 (2011) 1-25.
- [19] B. Dejaegher, Y. Heiden, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 698-715.
- [20] Y. Guo, S. Gaiki, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011), 5920-5938.
- [21] J. Ruta, S. Rudaz, D. V. McCalley, J. Veuthey, D. Guillarme, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8230-8240.
- [22] G. S. Philibert, S. V. Olesik, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8222-8230.
- [23] L. Nováková et al., *Talanta* 68 (2006) 908-918.
- [24] J. Chen, W. Wang et. al., *Anal. Chim. Acta* 650 (2009) 3-9.
- [25] P. N. M. Demacker et. al., *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 387-392.
- [26] M. Dobrinás, E. Choong et. al., *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 3574-3582.
- [27] Y. Zhang et. al., *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 2023-2033.
- [28] A. Cutignano et. al., *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 93 (2010) 25-29.
- [29] C. C. Jacob, G. G. da Costa, *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 652-656.
- [30] A. Spielmeyer, G. Pohnert, *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 3238-3242.

- [31] S. H. Kirsch, W. Herrmann, Y. Rabagny, R. Obeid, J. of Chromatogr. B, 878 (2010) 3338–3344.
- [32] G. Kesiūnaitė, E. Naujalis, A. Padaruskas, J. Chromatogr. A, 1209 (2008) 83-87.
- [33] F. Marclay, E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, Florens. Sci. Int., 213 (2011) 73-84.
- [34] J. Zhang et al. Analytical Biochemistry, 413 (2011) 164-170.
- [35] I. Imbuluzqueta, M.A. Campanero et al., J. Chromatogr. B, 879 (2011) 3490–3496.
- [36] M. Kolmonen, A. Leinonen, T. Kuuranne, A. Pelander, J. Chromatogr. B, 878 (2010) 2959–2966.
- [37] J. H. Jacobsen, K. Schmiegelow, J. Nersting, J. Chromatogr. B, 881– 882 (2012) 115– 118.
- [38] Vřešťál J. et al., Hmotnostní spektrometrie, 2. vydání, Masarykova univerzita v Brně (2002) 4, 27-31, 35.
- [39] Český lékopis 2009, GRADA Publishing a.s. (2009) 133.
- [40] M. Vokurka, J. Hugo et al., Velký lékařský slovník, 7. vydání, Jessenius Maxdorf (2007).
- [41] H. Lüllmann et al., Farmakologie a toxikologie, GRADA Publishing a.s. (2004).
- [42] P. Liegbott, A. Amouric, A. Comte, Research in microbiology, 160 (2009) 757-766.